FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LILLE

Année Scolaire
1929-1930

N° 11

THÈSE

POUR

L'OBTENTION DU

DIPLOME SUPÉRIEUR

de Pharmacien de 1re Classe

présentée et soutenue le 27 Juin 1930, à 17 heures 30

PAR

LESPAGNOL (Albert - Henri - Jules)

Né le 7 Août 1901 à Bruille-Notre-Dame (Nord)

Pharmacien
Ex-Aide Préparateur de Pathologie Interne et Expérimentale
Ex Préparateur de Chimie Organique
Ex Préparateur de Bactériologie à l'Institut Pasteur
Chef des Travaux pratiques de Chimie Biologique à la Faculté de Médecine de Lille

Les Glucides du Lait de Femme

(Travail du Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine)

Le Candidat répondra, en outre, aux questions qui lui seront adressées sur les différentes parties de l'enseignement pharmaceutique

JURY DE LA THÈSE

Président de la Thèse : M. POLONOVSKI

Suffragants : MM. E. GÉRARD
VALLÉE
MORVILLEZ

LILLE
IMPRIMERIE CENTRALE DU NORD
12, Rue Lepelletier

1930

FACULTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LILLE

Année Scolaire
1929-1930

N° 11

THÈSE

POUR

L'OBTENTION DU

DIPLOME SUPÉRIEUR

de Pharmacien de 1re Classe

présentée et soutenue le 27 Juin 1930, à 17 heures 30

PAR

LESPAGNOL (Albert - Henri - Jules)

Né le 7 Août 1901 à Bruille-Notre-Dame (Nord)

Pharmacien
Ex-Aide Préparateur de Pathologie Interne et Expérimentale
Ex Préparateur de Chimie Organique
Ex Préparateur de Bactériologie à l'Institut Pasteur
Chef des Travaux pratiques de Chimie Biologique à la Faculté de Médecine de Lille

Les Glucides du Lait de Femme

(Travail du Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine)

Le Candidat répondra, en outre, aux questions qui lui seront adressées sur les différentes parties de l'enseignement pharmaceutique

JURY DE LA THÈSE

Président de la Thèse : M. POLONOVSKI

Suffragants : MM. E. GÉRARD, VALLÉE, MORVILLEZ

LILLE
IMPRIMERIE CENTRALE
12, rue Lepelletier, 12

1930

UNIVERSITÉ DE LILLE

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Doyen : M. Ch. Dubois (I. ✪). — Assesseur : M. Gérard E. (✻ I. ✪)

Clinique médicale	MM. Carrière (✻, I. ✪),	professeur
	Combemale (O. ✻, I. ✪ M)	id.
Clinique chirurgicale	Gaudier (O. ✻, ⚕, I.✪,)	id.
	Lambret (C ✻, I. ✪),	id
Clinique des mal. cutanées et syphilit.	Charmeil (✻, I. ✪),	id.
Clinique obstétricale	Bué (✻, I.✪),	id.
Pathologie interne et expérimentale et Clinique des maladies de l'appareil digestif	Surmont (✻, I. ✪, ✠),	id.
Pathologie externe et Clinique des maladies des voies urinaires	Potel (✻, ⚕, I.✪),	id.
Anatomie pathol. et Pathol. générale	Ingelrans (I. ✪),	id.
Physiologie	Dubois (I.✪),	id.
Anatomie	Cordier (A ✪)	id.
Histologie	Debeyre (O.✻, ⚕, I.✪,✠),	id.
Chimie minérale et Toxicologie	Vallée (✻, I. ✪),	id.
Chimie organique	Polonovski (⚕, A. ✪).	id.
Matière médicale et Botanique	Fockeu (✻, I. ✪, ⚕, ✠),	id.
Pharmacie et Pharmacologie	Gérard (Ernest) (✻. I. ✪),	id.
Zoologie médicale et pharmaceutique	Desoil (✻, I. ✪ ⚕),	id.
Accouchements et Hygiène de la première enfance	Paucot (A. ✪),	id.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	Le Fort (O, ✻, ⚕, I.✪, O. ✠),	id.
Clinique psychiâtrique	Raviart (✻, I. ✪),	id.
Clinique médicale infantile	Minet (I. ✪),	id.
Thérapeutique	Doumer (I. ✪),	id.
Médecine opératoire	Vanverts (✻, I. ✪).	id.
Hygiène et Bactériologie	Pierret (I ✪),	id.
Médecine légale et Médecine sociale	Leclercq (✻, ⚕ I. ✪),	id.
Hydrologie et Crénothérapie	Duhot (I✪),	id.

Professeurs titulaires non pourvus de chaire

MM. P. Combemale (A. ✪.); Morvillez (A. ✪).

Cours complémentaires

Clinique ophtalmologique	MM. Toulant	Chargé du Cour
Clinique oto-rhino-laryngologique	Debeyre(M.)(O,✻, ⚕, I.✪),	id.
Chimie analytique	Polonovski (⚕I. ✪,),	id.
Physique pharmaceutique	Sonneville (A. ✪),	id.
Parasitologie	Lavier	id.
Deontologie	Bertin (✻, I. ✪),	id.
Physique médicale	Fabre(I✻, ✪).	id.

Doyens honoraires : MM. de Lapersonne (✻, I. ✪), Combemale (O.✠ I.✪, M), et Charmeil (✠, I, ✪,).

Professrs honorres: MM. Moniez (O. ✻, I. ✪), Calmette (C. ✪), Lescœur (I ✪,) Baudry (✻. I. ✪. ✠), Verdun (✻) Debierre (✻ I✪), Doumer, (✻ I✪) Curtis (✠ I ✪), Lemoine, (✻ I ✪), (Bedart, O.✻, I ✪, ✠).

Agrégés en exercice :

MM. Gérard M. (⚕ I. ✪). P.Delannoy. (A.✪). Paque (⚕ A ✪), Bertin,(✻ Legrand (✪ ✠A ✪), Swynghedauw (✪I✪), Lavier (✪) Auguste,Gérne Nayrac.

La Faculté a décidé que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle entend y attacher aucune approbation ni improbation. (Décision de la Faculté) en date du 28 février 1878).

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A MA FEMME,

Dont le souriant optimisme et l'humeur toujours égale ont été mon soutien de chaque jour.

A MON FILS

A MES PARENTS

Dont la vie de labeur incessant et de parfaite droiture est mon meilleur guide.

A MA GRAND'MÈRE.

A MES FRÈRES.

A MON PARRAIN,

A MES BEAUX-PARENTS,

En témoignage d'affection.

A MON MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE,

MONSIEUR LE PROFESSEUR POLONOVSKI,

Mon cher Maître,

Voici près de dix années que vous m'avez accueilli dans votre laboratoire, et depuis lors vous n'avez cessé de m'honorer de votre bienveillance et de votre estime.

Vous avez voulu me former à la discipline de l'expérience chimique et c'est à vous que je dois le meilleur de ce travail.

Il n'est d'ailleurs aucun événement heureux de ma vie universitaire que vous n'ayez provoqué.

Permettez-moi de vous en exprimer ma respectueuse et profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur GERARD,

Membre Correspondant de l'Académie de Médecine,

Chevalier de la Légion d'Honneur

En reconnaissance de l'accueil bienveillant que nous trouvons toujours auprès de lui.

A Monsieur le Professeur VALLEE,

Chevalier de la Légion d'Honneur

En témoignage de respectueuse gratitude pour les conseils éclairés qu'il nous a prodigués en toute circonstance.

A Monsieur le Professeur MORVILLEZ.

A qui nous sommes heureux d'exprimer notre gratitude pour l'intérêt qu'il daigne nous témoigner.

A tous mes Maitres.

A Monsieur le Professeur SURMONT,

Chevalier de la Légion d'Honneur

Qui nous a admis comme aide-préparateur dans son Laboratoire et nous y accueille toujours avec une bienveillance dont nous nous honorons.

A Monsieur le Docteur GRYSEZ,

Chef de Service à l'Institut Pasteur,

Chevalier de la Légion d'Honneur

Hommage respectueux et reconnaissant.

A Monsieur G. LECOUVEY,

En témoignage d'affection.
En reconnaissance de l'intérêt qu'il porte à ma famille.

Aux joyeux témoins de ma vie estudiantine,

E. BARTIER, M. CARTON, R. MEESEMAECKER,

G. CAZIN.

Aux Préparateurs du Laboratoire de

Chimie Biologique,

Dont la collaboration active et dévouée m'a été précieuse.

Introduction

Quand, il y a plusieurs années déjà, notre Maître, M. le professeur Polonovski, nous conseilla d'étendre aux glucides du lait la méthode de dosage par oxydation chromique qu'il avait préconisée, nous étions loin de prévoir la longue série de recherches auxquelles nous conduirait cette étude.

En effet, alors que cette méthode s'appliquait fort bien au lait de vache, nous avons toujours obtenu pour le lait de femme des résultats trop forts que nous avons immédiatement attribués à la présence de la substance déjà signalée par Denigès qui influait sur le pouvoir rotatoire du lactosérum.

Nous fûmes ainsi tout naturellement amené à étudier ce composé inconnu, puis à faire de cette étude la partie principale de notre travail.

Nos recherches paraissaient alors devoir se limiter à l'isolement de la substance perturbatrice, et à la détermination de ses propriétés. Mais à ce problème primitif se sont greffées en cours de route de nombreuses questions connexes que nous avons dû résoudre.

C'est ainsi que devant les chiffres différents signalés dans la littérature pour le pouvoir réducteur du produit de l'hydrolyse du lactose, nous avons été contraints de reprendre cette étude ainsi que celle des variations pos-

sibles du pouvoir rotatoire du lactose sous l'influence de la dessiccation, de la chauffe en présence d'alcalis dilués, etc. D'autre part, la fermentation lactique à laquelle nous avions primitivement eu recours pour détruire le lactose, a été pour nous l'occasion de montrer la complexité de cette fermentation et la difficulté où l'on se trouve de tirer des conclusions certaines en présence de phénomènes aussi obscurs.

Nous avons également soumis à une critique sévère les méthodes d'analyse du lait, afin de confirmer l'existence d'un « non-dosé ».

Il faut ajouter encore les difficultés qui ont surgi devant nous à tout instant: présence inconstante dans le lait colostral de globulines levogyres se comportant d'une façon bien imprévue vis-à-vis des déféquants ordinaires — formation dans les laits, non déféqués immédiatement, de peptones levogyres dérivées de la caséine, précipitables seulement par le tanin, dont l'élimination ultérieure introduit des réactifs capables d'altérer les sucres — polymorphisme de l'osazone du lactose, aux aspects microscopiques différents, suivant les conditions de cristallisation, sans parler des nombreuses méthodes de dosage des sucres avec lesquelles nous avons dû nous familiariser, ni de celles que nous avons établies pour permettre une analyse de lait de femme sur quelques cm^3.

C'est assez dire que conserver dans cet exposé l'ordre chronologique, reflet fidèle de nos recherches, aurait dissimulé sous l'amas de problèmes de second plan le véritable objet de ce travail. Aussi avons-nous jugé plus rationnel d'adopter l'ordre suivant.

Nous consacrerons un premier chapitre aux propriétés du lactose et nous insisterons particulièrement sur ses

isomérisations, son hydrolyse et ses altérations possibles en milieu alcalin.

Nous aborderons ensuite l'étude du lait de femme et après avoir confirmé l'existence d'un non dosé, nous le rattacherons à l'anomalie optique. Nous montrerons ensuite comment nous avons isolé du lait de femme de nouveaux composés glucidiques et nous donnerons enfin un procédé de dosage des « glucides totaux » que nous compléterons par une méthode de dosage du lactose, de la caséine et du beurre pour constituer ainsi une semi-microméthode complète d'analyse du lait de femme.

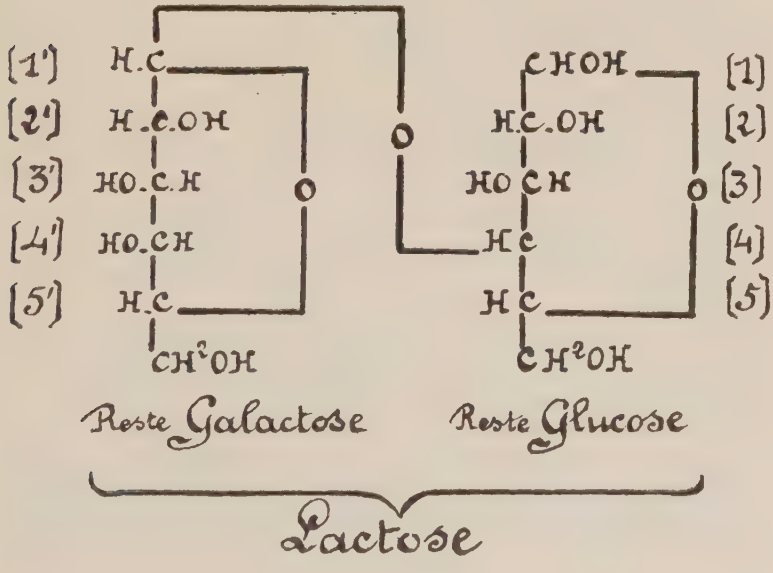
Chapitre I

Propriétés du lactose

Nous nous limiterons ici aux propriétés du lactose auxquelles nous serons amené à faire appel.

A) *FORMULE DU LACTOSE*

Le lactose est, comme on sait, un sucre réducteur en C^{12} qui donne, par hydrolyse, du glucose et du galactose. La dernière formule proposée pour cet oside en fait le 1 *β galactosido* (1,5), 4 *β glucose* (1,5).



Cette formule s'accorde avec toutes les propriétés du lactose. En effet :

I. — *Le groupement réducteur du lactose appartient à la molécule de glucose,* car :

a) Le lactose donne par oxydation de l'acide lactobionique que l'hydrolyse scinde en galactose et acide gluconique (Fischer et Meyer [1]) ;

b) L'acide lactose-carbonique obtenu par la synthèse classique des cyanhydrines s'hydrolyse en galactose et acide glucoheptonique (Reinbrecht [1]) ;

c) La lactosazone peut être scindée sous l'action des acides en galactose et glucosone (Fischer [2]).

II. — *Le pont oxydique qui unit les deux sucres s'attache en* 1' *sur le galactose et en* 4 *sur le glucose.*

L'attache se fait nécessairement en 1' sur le galactose puisque le groupement aldéhydique du galactose est bloqué dans la molécule de lactose.

D'autre part, le fait que la dégradation méthodique du lactose donne un galacto-arabinose capable de donner une osazone par les carbones 2 et 3, exclut la possibilité d'une attache en ces mêmes carbones (Ruff et Ollendorf [1]) et laisse seules possibles les positions du pont en 4, 5 ou 6.

Mais si l'on admet les dernières conclusions de Haworth [2] au sujet de la formule du glucose, on voit que l'attache en 5 est de ce fait éliminée (voir note 1).

Note 1. — L'école de Haworth se basant sur ce que les lactones triméthyl araboniques obtenues à partir des formes stables de l'arabinose, présentent une mutarotation très rapide tout comme la lactone gluconique, en déduisent l'identité de structure du glucose

D'autre part, comme l'hydrolyse du lactose octométhylé donne, outre le tétraméthylgalactose, le triméthylglucose 2, 3, 6 (Haworth et Leicht [2], Pryde, Hirst et Humphrey [1]), l'attache du pont se trouve ainsi fixée en 4 (voir note 2).

La formule du lactose rend compte également de la lactonisation rapide de l'acide lactobionique (Levene [1]) et de l'hydrolyse du lactobionate de Ba octométhylé, en tetraméthylgalactose et en tétraméthylglucolactone (Haworth [3]).

et de l'arabinose. Or il est prouvé par ailleurs que l'arabinose possède un cycle en 1,5: l'hydrolyse du triméthyl-méthylarabinoside donne en effet un triméthylarabinose qui conduit par oxydation au même acide triméthoxy-glutarique que celui que l'on obtient par méthylation de l'acide trioxy-glutarique d'oxydation directe de l'arabinose.

L'étude des produits d'oxydation de l'acide méthylgluconique apporte également un argument en faveur de ce cycle hexagonal (Hirst [1]).

Note 2. — La formule du triméthylglucose obtenu par hydrolyse de l'octométhyl-lactose découle des considérations suivantes: Il réduit la liqueur de Fehling et ne perd aucun méthyle par hydrolyse, ce qui prouve que le carbone 1 n'est pas méthylé. Le carbone 2 est méthylé puisque le triméthylglucose ne donne pas d'osazone. D'autre part, le fait que le pont du lactose ne peut être attaché en 3 (voir plus haut), laisse cet oxhydryle libre et capable par conséquent de se méthyler au cours de la méthylation du lactose. Le troisième groupe méthyle ne peut donc se trouver qu'en 4 ou 6. Or ce triméthylglucose est différent du triméthylglucose obtenu à partir du gentiobiose méthylé, qui lui également méthylé en 2 et 3, doit avoir l'oxhydryle 6 libre comme le prouve sa synthèse effectuée à partir de l'acéto-dibromo-glucose (Cf. Cramer [1]).

(1) Bertrand et Thomas. — Manip. Ch. Biol., p. 79.

III. — *Le glucose et le galactose se trouvent tous deux dans le lactose sous leur forme stable* 1,5, *configuration β.*

Ceci résulte de ce que le tétraméthylgalactose obtenu par hydrolyse de l'octométhyllactose est identique au dérivé obtenu par méthylation du galactose ordinaire, et de ce que le triméthylglucose venant de l'hydrolyse de l'octométhyllactose donne par méthylation le tétraméthylglucose dérivé du glucose stable.

D'autre part, la synthèse du lactose effectuée par Pictet, à partir du β galactose et du β glucose, semble montrer que ces sucres existent sous cette forme dans le lactose (Pictet [1] et [2]).

Le lactose peut se présenter physiquement sous deux aspects :

a) lactose hydraté,

b) lactose anhydre.

Le lactose hydraté qu'on obtient par cristallisation de ses solutions aqueuses sursaturées, cristallise avec une molécule d'eau. Chauffé, il ne perd son eau qu'à la température de 130°.

Le lactose anhydre s'obtient en évaporant à 100° une solution de ce sucre (Denigès [1]).

Le lactose est très soluble dans l'eau. Il s'en dissout une partie dans 5 p. 87 d'eau à 10°, et dans 2,5 p. à 100° (Dubrunfaut [1]). Il donne facilement des solutions sursaturées. Il est peu soluble dans l'alcool méthylique et dans l'alcool éthylique.

B) *POUVOIR ROTATOIRE DU LACTOSE*

Le pouvoir rotatoire spécifique déterminé par Denigès et Bonnans [2] et qui s'accorde avec les déterminations des autres auteurs, est pour le lactose hydraté à 20°

$$[\alpha_D] = 52°53,$$

ce qui donne pour le lactose anhydre, très sensiblement

$$[\alpha_D] = 55°30.$$

On a décrit des formes de lactose dont le pouvoir rotatoire spécifique était différent de 52°53 et en particulier Schmöger et Erdmann [1] et Van Leent [1] ont décrit les modifications que pouvait subir le pouvoir rotatoire du lactose par évaporation à chaud de ses solutions.

On en était arrivé de cette façon à admettre l'existence de cinq lactoses de pouvoirs rotatoires différents. Tanret [1] a éclairci cette question en montrant « que « le pouvoir rotatoire immédiat des sucres obtenus par « les auteurs précités, diminuait ou augmentait gra- « duellement pour se fixer définitivement à $[\alpha_D] = 56°$ « (environ). Or de ceux dont le pouvoir rotatoire aug- « mente, on peut retirer un sucre dont l'$[\alpha_D] = 34°5$. « D'autre part, comme le lactose ordinaire en solution « aqueuse a un $[\alpha_D]$ immédiat de 92°6 qui s'achemine « avec le temps vers un $[\alpha_D]$ de 56°, il n'y a lieu d'ad- « mettre comme états isomériques distincts du sucre de « lait que ceux qui ont les pouvoirs extrêmes instables

$$[\alpha_D] = + 92°6 \text{ Lactose } \alpha,$$

$$[\alpha_D] = + 34°5 \text{ Lactose } \beta. »$$

C) *HYDROLYSE DU LACTOSE*

Le lactose soumis à l'action hydrolysante des acides dilués dans des conditions convenables de température et de concentration est scindé en glucose et galactose, et le mélange équimoléculaire de ces deux hexoses possède un pouvoir réducteur supérieur à celui de la solution de lactose primitive.

Brachin [1] et Porcher [1] ont particulièrement étudié l'hydrolyse du lactose, et ce dernier auteur conclut « que le rapport des poids de cuivre fournis lors de la « réduction de la liqueur de Fehling (méthode d'Allihn) « 1° par le lactose hydrolysé; 2° par le lactose non hy- « drolysé, est variable suivant que l'hydrolyse est obte- « nue par les acides ou par la lactase. Il est égal à 1,31 « pour l'hydrolyse effectuée avec la lactase, et oscille « autour de 1,29 pour l'hydrolyse effectuée au moyen « des acides (3/4 d'h. à 105°-107° par 1,5 % d'SO^4H^2) ».

Nous avions au début de nos recherches adopté les chiffres précédents avec d'autant plus de sécurité que ce coefficient est cité ailleurs (Morel [1]) et qu'une vérification trop hâtive que nous en avions effectuée nous avait fait croire tout d'abord à son exactitude.

Mais une critique plus attentive nous a montré que les chiffres de Porcher étaient entachés d'erreur. En effet, cet auteur attribue au lactose anhydre un pouvoir réducteur tel que 0 gr. 0647 de ce dernier sucre équivale à 0,050 de glucose. Or, on sait maintenant que la quantité de lactose qui a le même pouvoir réducteur que 0,05 de glucose, oscille autour de 0 gr. 07 (0,0695 d'après Guiart et Grimbert [1] et 0,0724 (Yvon et Michel [1]).

D'autre part, si on détermine par le calcul au moyen des tables de Bertrand le rapport des quantités de cuivre

produites par une certaine quantité de lactose avant et après hydrolyse, on arrive aux résultats suivants :

LACTOSE ANHYDRE	CUIVRE EN MMGR	Cuivre provt du glucose	Cuivre provt du galactose	CUIVRE TOTAL	RAPPORT
19	27.9	20.4	19.3	39.7	142
38	52.7	40 1	37.9	78.0	148
57	77.5	59.1	56.2	115.3	148
76	101.7	77,5	73.9	151.4	148
95	125.2	95.4	91.2	186 6	148

Ces dernières données théoriques ne tiennent compte, il est vrai, ni de l'altération possible des sucres sous l'influence de la chauffe à l'autoclave, ni des variations qui peuvent affecter leur pouvoir réducteur propre du fait qu'ils sont accompagnés d'un autre sucre. Il importait donc de déterminer expérimentalement le pouvoir réducteur du mélange de glucose et de galactose obtenu par hydrolyse du lactose sous l'influence des acides dilués.

Nous avons effectué de nombreuses hydrolyses en employant comme agents hydrolysants SO^4H^2 N/4 et HCl 1/20. Les solutions étaient ou bien chauffées à l'autoclave à 105°-110° pendant 3/4 d'heure, ou portées à l'ébullition durant environ une heure en maintenant le volume constant à l'aide d'un réfrigérant ascendant.

Dans ces conditions, le rapport des poids de cuivre fournis par une solution de lactose avant et après hydrolyse, est voisin de 1,40. Ce chiffre, très supérieur à celui proposé par Porcher, s'accorde bien avec les déterminations de Hildt [1] (1,392 et de Denigès (1,42).

Il faut néanmoins remarquer que les erreurs d'expérience peuvent influer d'une façon assez sensible sur la détermination de ce rapport ainsi qu'en témoigne le tableau suivant :

Bertrand avant hydrolyse	Bertrand après hydrolyse en cm^3 de MnO^4K à 5 o/oo	Rapport
6,25	8,75	1,40
6,20	8,75	1,41
6,30	8,80	1,39
6,25	8,70	1,40

soit, en prenant les chiffres extrêmes :

6,20	8,80	1,42
6,30	8,70	1,38

Nous avons par ailleurs remarqué que l'hydrolyse du lactose était assez irrégulière et que des solutions de même titre, hydrolysées pratiquement dans des conditions aussi semblables que possible, ne possédaient pas toujours exactement le même pouvoir réducteur.

Enfin, la précision des dosages est encore diminuée du fait que le lactose a, vis-à-vis de la liqueur de Fehling, une action réductrice moins rapide que les hexoses. Les premiers expérimentateurs avaient fixé le temps de réduction à 5 minutes pour le lactose et à 2 minutes pour le glucose et le galactose. G. Bertrand, pour éviter les difficultés qu'on rencontrerait dans le dosage d'un mélange d'hexoses et de lactose, a unifié le temps de réduction et dressé des tables pour une ébullition uniforme de 3 minutes. Il n'en reste pas moins vrai qu'au bout de ce temps le lactose a tout juste donné la mesure de son pouvoir réducteur et qu'une ébullition tant soit peu in-

férieure à 3 minutes peut affecter le dosage d'une légère erreur par défaut. Or il est parfois assez difficile de discerner le début d'une ébullition dans une liqueur très concentrée en soude. Ces diverses raisons peuvent entacher le dosage du lactose d'erreurs assez sensibles.

On comprend alors pourquoi il est difficile de donner au rapport des poids de cuivre fournis lors de la réduction de la liqueur de Fehling par une solution de lactose après et avant hydrolyse une valeur absolument fixe.

Pour la commodité de l'exposition, nous appellerons ρ ce rapport et nous admettrons que pour le lactose pur, hydrolysé par SO^4H^2 N/4 à 105-110° durant 3/4 d'heure ou par HCl 1/20 1 heure à l'ébullition, ρ est voisin de 1,40 et oscille de 1,37 à 1,43.

D) *TRANSFORMATION DU LACTOSE SOUS L'INFLUENCE DES ALCALIS.*

Dans nos expériences sur le lactosérum de femme, nous avons souvent été gênés par la présence de peptones, vraisemblablement dérivées de la caséine, précipitables seulement par le tanin acétique. L'élimination de ces peptones nécessitait donc l'addition d'une certaine quantité de tanin, qui, actif lui-même sur la lumière polarisée et donnant de plus du glucose par hydrolyse, devait pour ces deux raisons être ensuite soigneusement éliminé.

Nous avons précipité le tanin au moyen de l'acétate de plomb et l'excès de plomb par H^2S. L'excès d'hydrogène sulfuré était ensuite chassé par un courant d'air. Cette suite d'opérations introduisait dans la solution des acides [acide acétique (tanin acétique) et acide sulfu-

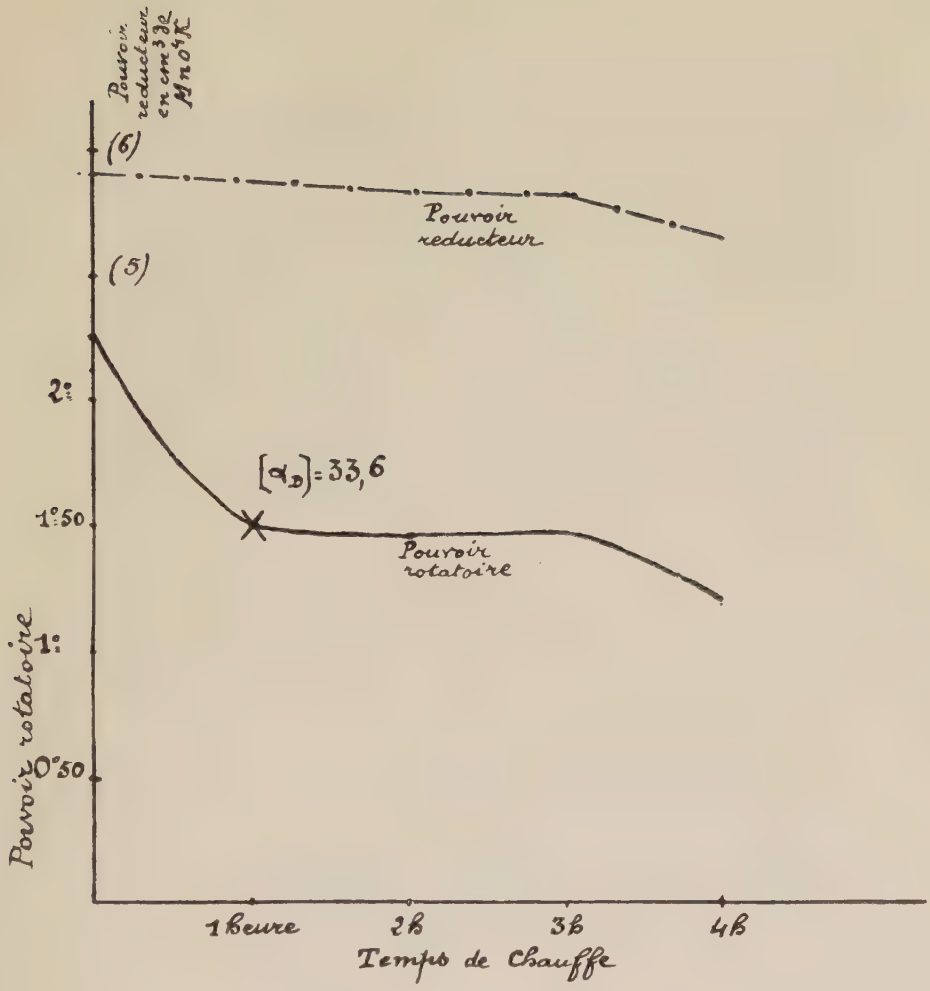
rique provenant de l'action du courant d'air sur H^2S] que nous avons neutralisés par CO^3Ca. La liqueur filtrée était ensuite soumise aux concentrations et cristallisations habituelles. Nous nous sommes rapidement rendu compte que dans ces conditions le lactose s'altérait profondément, ce dont témoignait le noircissement intense des solutions.

Nous avons alors été amené à étudier l'influence des alcalis faibles (carbonate de chaux, acétate de chaux, acétate de soude) sur le lactose.

Nous ne détaillerons que les expériences effectuées avec l'acétate de Ca. Le carbonate de Ca nous a donné des résultats comparables bien que son action paraisse plus brutale.

Action de l'acétate de Ca à 1 % :

Lactose à 25 °/oo (environ)	Acetate de Ca à 10°/o	Durée de l'ébullition	Bertrand en cm3 de MnO^4K 10 °/o	α_D	Bertrand apr. hydrolyse	Rapport de cuivre ρ
50 cm3	5 cm3	néant	5.80	2°23	7.90	136.7
»	»	5 minutes	5.80	2°13	?	
»	»	1 heure	5.75	1°53	7.80	137
»	»	2 heures	5.65	1°43	7.80	138
»	»	3 heures	5.60	1°43	7.65	136
»	»	4 heures	5.15	1°20		



L'examen de la courbe ci-dessus nous montre que le pouvoir réducteur de la solution n'est que peu influencé et que le rapport de cuivre après hydrolyse se maintient sensiblement égal à la valeur admise pour le lactose. Il semble donc normal d'admettre que le premier effet de l'acétate de chaux est une simple isomérisation.

D'autre part, nous n'avons pas été sans remarquer que le pouvoir rotatoire restait à peu près constant pour une

valeur fort voisine du pouvoir rotatoire du lactose β. Il était tentant d'en conclure que la première action de l'acétate de chaux était de transformer le lactose α en lactose β, d'autant plus que le maltose traité dans les mêmes conditions présente dans les variations de son pouvoir rotatoire un palier pour des valeurs voisines de + 118°, pouvoir rotatoire spécifique du maltose β. Mais il s'agit probablement d'une coïncidence fortuite, car l'addition d'acide chlorhydrique ou d'acide oxalique à une solution de pouvoir rotatoire abaissé ne le ramène pas à sa valeur primitive, ce qui n'eût pas manqué de se produire s'il s'était agi d'un simple déplacement d'équilibre vers la forme β.

D'autre part, nous avons pu retirer de ces liqueurs un produit lévogyre dont nous avons commencé l'étude :

100 gr. de lactose dissous dans 500 cc. d'eau environ sont traités durant 2 heures à l'ébullition par 10 gr. de CO^3Ca. La liqueur obtenue, filtrée, est évaporée dans le vide à une température voisine de 50°. Le résidu de l'évaporation est traité par l'alcool méthylique qui dissout les sucres provenant de l'altération du lactose. Les solutions méthyliques concentrées abandonnent une croûte cristalline constituée en grande partie par du lactose et les eaux mères sont précipitées par l'alcool éthylique.

En opérant de cette façon, nous avons obtenu des produits brunâtres dont l'$[\alpha_D]$ spécifique variait de — 17° à — 10°. Ces composés sont très vraisemblablement des mélanges de sucres assez complexes, auxquels s'ajoutent encore les sels de Ca des acides provenant de la destruction du sucre.

Nous nous proposons de poursuivre l'étude de ces mélanges; nous nous sommes borné pour l'instant aux déterminations suivantes :

1°) Dosage approximatif du galactose par transformation en acide mucique.

3 gr. de produit brut sont dissous dans 50 cm^3 d'eau (ce qui correspond à 4,36 % de produit sec). On prélève 40 cm^3 de la solution que l'on oxyde par NO^3H, suivant la technique habituelle (1). On obtient après trois jours, une cristallisation abondante d'acide mucique, souillé d'une assez forte quantité de sels de chaux. On traite le précipité par un excès de NaOH titrée, on lave à l'eau chaude et on titre l'excès de soude.

On obtient ainsi 0 gr. 56 d'acide mucique pour 1 gr. 75 de produit sec, soit 31 %.

D'après Bertrand, le lactose traité dans les mêmes conditions, donne sensiblement le 1/3 de son poids d'acide mucique.

2°) Recherche des cétoses.

La réaction de Sélivanof se montre fortement positive. D'autre part, si on effectue des hydrolyses sous l'influence de HCl au 1/20, on saisit à un moment donné une diminution du pouvoir réducteur s'alliant à une augmentation du pouvoir rotatoire, ce qui correspond vraisemblablement à la destruction d'une cétose lévogyre.

Solution avec 3 gr. 30 de produit brut dans 100 cc. d'eau $\alpha_D = -0°50$, Bertrand sur 1 cc. = 3 cc. 40, Barfoeld 1 cc. 15.

(1) Bertrand et Thomas — Manipul de Chimie biologique, p. 79.

SOLUTION	HCl	DURÉE de l'ébulition	complété à 20 cm³ et clarifié au charbon	α_D	BERTRAND	BARFŒLD
15 cm³	0 cm³ 75	10 minutes		+ 0°13	3 cm³ 75	2.65
»	»	25 minutes		0°73	4 cm³ 10	3.95
»	»	35 minutes		0°90	4 cm³ 65	4.70
»	»	1 heure		1°10	4 cm³ 25	4.25

Cette expérience montre: 1° que la substance dissoute contenait des hexoses puisque le Barfoeld au début a donné 1 cc. 15 ;

2° que l'hydrolyse a été maximum au bout de 35 minutes ;

3° qu'à ce maximum, a succédé une chute du pouvoir réducteur et une augmentation du pouvoir rotatoire.

Tout ceci s'explique si l'on admet que la substance étudiée est constituée en grande partie par un disaccharide lévogyre donnant par hydrolyse un sucre cétonique.

Remarquons ici qu'il est difficile de tirer de la valeur du pouvoir rotatoire une indication sérieuse sur la nature des sucres obtenus par hydrolyse, en raison d'abord de la destruction des cétoses et de la coloration intense des solutions hydrolysées qui nécessite des classifications répétées au noir animal.

Ce traitement enlève une notable quantité de sucre dont il n'est même pas possible de tenir compte puisqu'on ignore si l'action adsorbante du charbon s'est fait sentir d'une façon identique sur les produits d'hydrolyse ou s'est exercée électivement sur l'un de ces produits.

Osazones. — Nous avons fait l'osazone du composé lévogyre et obtenu ainsi un produit soluble dans l'eau

chaude et cristallisant par refroidissement. Après recristallisation, son point de fusion était de 169°-170° et de 166° à la fusion instantanée au bloc Maquenne.

D'autre part, l'osazone effectuée sur les produits d'hydrolyse nous a donné les cristaux caractéristiques de glucosazone.

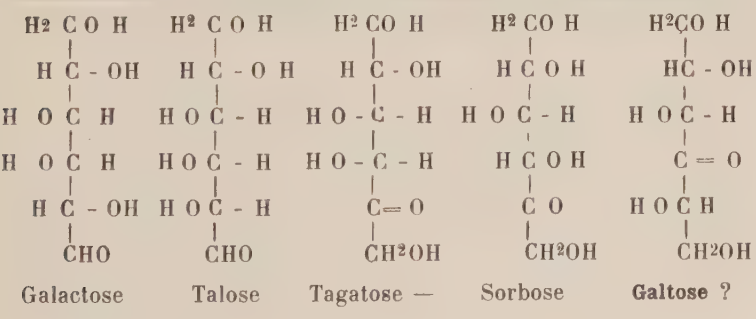
Voyons maintenant comment interpréter ces résultats à la lumière des travaux qui sont pour une grande part l'œuvre de Lobry de Bruyn et de ses élèves [1].

Ces savants ont montré que l'action des alcalis sur le glucose produisait du mannose et du fructose, c'est-à-dire des sucres donnant la même osazone.

Le galactose dans ces conditions devait donner du talose et du tagatose. C'est ce qui se produit en effet, mais à côté de ces deux hexoses donnant la même osazone que le premier, on saisit la formation d'autres sucres.

L'action des alcalis sur le galactose par exemple, donne naissance à un aldose: le talose, et à trois cétoses: le tagatose, le galtose et le sorbose (primitivement appelé pseudo-tagatose).

Ces différents sucres répondent aux formules suivantes :



le galactose ne se limite pas à une rotation du carbone voisin du carbone pseudo-aldéhydique.

Toutefois, dans le cas qui nous occupe, la première hypothèse qui se présente à l'esprit est celle d'une transformation du reste glucosique du lactose en un reste fructosique. Ceci cadrerait d'une part avec le fait que le galactose reste intact (acide mucique), avec la présence de cétoses et avec l'obtention de glucosazone à partir des produits d'hydrolyse. Mais dans ce cas l'osazone devrait être l'osazone du lactose. Or nous avons vu que l'osazone obtenue ne possédait pas le point de fusion de la lactosazone. On pourrait peut-être invoquer une action des alcalis sur la forme du cycle oxydique qui reprendrait après hydrolyse sa forme normale, mais il est plus prudent avant de formuler pareille hypothèse, d'essayer d'obtenir des produits plus purs afin de pouvoir interpréter les expériences en toute sécurité.

Nous n'avons pas encore terminé cette étude qui eut retardé de beaucoup l'achèvement de notre travail sur le lait de femme. Il nous suffisait provisoirement de montrer que le milieu alcalin était un gros écueil à éviter, et d'étudier quelques propriétés du lactose altéré pour pouvoir nous rendre compte si les sucres isolés dans le lait de femme ne provenaient pas d'altérations du lactose au cours des concentrations.

Chapitre II

La double énigme du lait de femme

Dans l'analyse des laits de femme on constate que, malgré tout le soin apporté dans le dosage des différents éléments, et quel que soit le nombre de composés déjà connus que l'on y dose, on n'arrive jamais, en groupant ces résultats, à retrouver le poids du résidu sec. La vérification de l'exactitude de l'analyse fait donc ici défaut. Il est vrai que dans l'examen des liquides biologiques on est accoutumé à trouver une différence entre le poids du résidu sec et la somme des substances dosées, mais on sait alors qu'il existe dans la plupart de ces liquides de nombreux composés pratiquement indosables et qui peuvent rendre compte de cette différence. Dans le lait de femme, au contraire, on n'a jusqu'à présent saisi aucun corps auquel on puisse imputer l'importance de ce « non dosé ».

A cette première anomalie, s'ajoute encore le fait que : si on examine un lait de femme au polarimètre, on lui trouve une déviation dextrogyre inférieure à celle que laisse prévoir la quantité de lactose dosée par les méthodes de réduction.

Nous examinerons successivement les deux aspects de ce problème :

A. - Détermination de l'indosé du lait de femme

1) *DETERMINATION DU RESIDU SEC.*

Dans une analyse biologique de quelque nature qu'elle soit, le dosage de l'humidité est une opération d'importance capitale. C'est elle en effet qui apporte la vérification des autres déterminations ou indique la quantité de substances non dosées. On conçoit dès lors pourquoi les biologistes se sont appliqués à préciser les conditions optima de la détermination du résidu sec des humeurs ou des tissus.

On se heurte ordinairement à deux difficultés : ou bien on opère à une température assez élevée et on risque d'altérer les substances organiques, ou bien on opère à une température plus basse et on risque de ne chasser l'eau qu'incomplètement.

Il semble d'ailleurs que l'on se soit plutôt appliqué à obtenir un résidu certainement inaltéré plutôt que complètement sec. C'est pourquoi la méthode qui consiste à dessécher le liquide examiné par un séjour prolongé dans le vide sulfurique, est celle qu'on s'accorde à trouver la meilleure. Mais la lenteur d'une telle opération a incité les chimistes à chercher d'autres procédés..

Meillère [1] en particulier conseille d'évaporer 5 cm^3 de lait à 37° pendant 2 ou 3 jours. Il obtient ainsi un résidu blanc où le lactose se trouve sous sa forme hydratée.

Tous les autres auteurs opèrent la dessiccation au B. M. ou à l'étuve à une température voisine de 100-105° et les procédés ne diffèrent que par l'introduction de certains coagulants (tels que l'acide acétique, le formol, l'acétone, destinés à empêcher la formation d'une croûte qui ralentirait l'évaporation.

Nous nous sommes borné à comparer les extraits secs obtenus par la méthode de Meillère et par le procédé de M. Cecil Revis qui consiste à évaporer au B. M. jusqu'à poids constant 10 cm³ de lait préalablement additionnés de 4 cm³ d'acétone. Nous avons fait suivre cette dessiccation d'un séjour d'une heure à 120°.

Voici les résultats obtenus :

	LAIT 1	LAIT 2
Dessication à 37°	122.50	99 80
» 100°	120.95	97.20
Différence	1 55	2.60
Lactose hydraté	48.17	66 60
anhydre	45 77	63 30
Différence	2 40	3.30
Dessication à 120°	118 50	95.70

Ces premiers chiffres nous montrent d'abord une première discordance entre l'extrait à 100° et l'extrait à 37°.

D'après Denigès, l'extrait à 100° contient le lactose à l'état anhydre, tandis qu'à 37° ce sucre ne perd pas son eau de cristallisation. On devrait donc constater entre les poids de matières dissoutes déterminés par ces deux procédés une différence égale au poids de l'eau de cristallisation du lactose. Or on ne constate rien de semblable.

On voit, d'autre part, que le séjour à 120° abaisse encore le poids du résidu sec, mais il faut prouver que cette perte de poids est due à un départ d'eau.

Nous croyons avoir montré par les deux expériences qui vont suivre que le chauffage durant une heure à 115°-120° :

1°) ne libère aucun produit carboné ;

2°) chasse un composé absorbable en entier par $CaCl^2$.

Première expérience. — Dans un Erlenmeyer à fond large — et dont l'ouverture peut s'adapter sur le bouchon de l'appareil de Desgrez (pour le dosage du carbone) — on introduit 5 cc. de lait et on le porte au B. M. pour chasser la majeure partie de l'eau. On l'adapte ensuite à l'appareil de Desgrez et on l'entoure d'un bain de SO^4H^2 qu'on porte à 120° et dont on vérifie soigneusement la température. Les produits de la combustion possible sont entraînés par un courant d'air privé de CO^2 sur une grille à oxyde de cuivre porté au rouge, puis dans un tube à boules contenant de l'eau de baryte. Après 1 h. 1/2 de chauffe à 115-120°, on ne constate aucun trouble de l'eau de baryte.

Deuxième expérience. — Dans un Erlenmeyer à large fond, on dessèche 5 cc. de lait au B. M. jusqu'à poids constant.

Quand on bout de 5 heures de chauffe le ballon est arrivé à poids constant, on le porte à la température de 120° et on fait passer à l'aide d'une trompe les gaz produits sur un tube à $CaCl^2$ taré.

On constate après 1 heure de chauffe que la perte en poids du ballon est sensiblement égale au gain du tube à $CaCl^2$.

	rés. sec
3 h. à 100°.....	0,6175
5 h. à 100°.....	0,6155
4 h. à 100°.....	0,6155

Après 1 h. à 120°..... 0,5830 perte = 0 gr. 0325.

Le tube à $CaCl^2$ a augmenté de 0 gr. 0322.

Donc, pour déterminer le résidu sec d'un lait, il est licite d'opérer après la dessiccation au B. M. un séchage d'une heure à 120°.

II) *DOSAGE DES MATIERES GRASSES.*

Le dosage du beurre dans le lait de femme ne présente rien de spécial, nous l'avons effectué par la méthode d'Adam.

III) *DOSAGE DE LA CASEINE.*

Le dosage des matières albuminoïdes et de la caséine dans le lait de femme présente d'assez nombreuses difficultés, et les différents procédés qui donnent de très bons résultats avec le lait de vache deviennent avec le lait de femme, beaucoup plus délicats et moins précis.

Pour doser les matières albuminoïdes totales du lait de femme, nous avons employé le procédé pondéral de Mercier, et nous avons suivi la technique indiquée par Grimbert [1] :

« Dans 100 cm^3 d'alcool à 96° additionnés de 2 gouttes « seulement d'acide acétique, on verse 10 cc. de lait. « Après quelques heures de repos, on reçoit le précipité « sur un filtre taré, on le lave d'abord avec un mélange « à parties égales d'éther et d'alcool à 96°. Puis finale- « ment par de l'éther, jusqu'à ce que quelques gouttes « de ce dernier évaporé dans un verre, ne laissent plus « de résidu. On sèche alors le filtre jusqu'à poids cons- « tant et on le pèse. On a ainsi le poids de caséine dans « 10 cm^3 de lait. On le rapporte au litre ».

Si on suit à la lettre cette technique, on s'expose à des erreurs. Nous avons, en effet, souvent remarqué que si le filtre, une fois séché et pesé, était traité par l'eau bouillante, il abandonnait à celle-ci une forte quantité

de sucre réducteur. Il paraît difficile, à première vue, d'enlever le lactose retenu par le coagulum de caséine, au moyen de lavages à l'alcool-éther. Aussi nous avons essayé de laver d'abord le précipité avec de l'alcool à 70c. Mais, en opérant de cette façon, il nous est parfois arrivé d'avoir finalement des eaux de lavage qui, évaporées, donnaient la réaction de Millon, ce qui prouvait que le lavage avait entraîné des protides. Pour obtenir, d'une part, un précipité absolument privé de sucre, et d'autre part des eaux de lavage ne contenant pas d'albumine, voici, à notre avis, comment il convient d'opérer: Une fois la précipitation et la filtration effectuées, on lave assez grossièrement avec un mélange d'alcool-éther. Puis on porte à l'étuve à 110° pendant une heure l'entonnoir et son contenu. De cette façon, les matières albuminoïdes sont insolubilisées et le coagulum moins compact est mieux préparé à l'action des solvants. On traite le précipité par l'alcool à 70c bouillant jusqu'à ce que tout le lactose soit enlevé, et on lave enfin à l'alcool, à l'alcool-éther, puis à l'éther pur. On sèche à 110° et on pèse.

Le précipité ainsi obtenu contient encore une certaine quantité de sels minéraux. Il convient donc de le calciner dans une capsule de platine tarée et de déduire le poids des cendres de celui du précipité.

Mais cette technique est trop longue pour être employée couramment; aussi nous nous sommes contenté de doser l'N total du produit obtenu par précipitation à l'alcool acétique.

IV) *DOSAGE DU LACTOSE.*

On peut doser le lactose dans le lait par une infinité de méthodes et nous n'avons nullement l'intention d'en entreprendre ici une revue complète. Nous attirerons

simplement l'attention sur les précautions qu'il faut prendre dans la défécation du lait si on veut obtenir de bons résultats en employant la méthode de Bertrand.

D'abord, il faut éliminer la défécation au Pb. Ce procédé expose à des erreurs considérables et l'on est même en droit de s'étonner que certains ouvrages classiques n'insistent pas suffisamment sur la nécessité d'enlever le Pb pour effectuer des dosages de sucre au Fehling.

Voici une expérience montrant l'influence de l'acétate de Pb :

Solution de lactose à 21 gr. 0/00 :

Lactose au Bertrand sans acétate de Pb..... 21 gr. 3

Lactose au Bertrand avec 1 cm^3 d'acétate de Pb. 19 gr.

D'autre part, si on enlève l'excès de Pb, on provoque l'apparition d'un précipité compact qui peut entraîner des quantités notables de sucre.

Signalons ici que, quoi qu'en disent certains auteurs (Sichuro-Miura [1]), la présence de mercure est à éviter soigneusement dans les dosages où on emploie la réduction des liqueurs cupriques. Le sucre réduit les sels mercuriques, économisant ainsi une certaine quantité de cuivre. La défécation au métaphosphate de soude nous a toujours donné entière satisfaction.

V) *DOSAGE DES CENDRES.*

Il n'est pas possible de déterminer le poids de cendres d'un lait sans effectuer un dosage de chlorures avant et après calcination. Il nous est souvent arrivé en effet de ne plus trouver après calcination que des traces de chlorures, alors que le lait examiné en contenait plus de 1 gr.

Il faut donc pour effectuer une détermination correcte

des matières minérales, ajouter au poids de cendres les chlorures chassés par calcination.

Voici quelques analyses complètes de lait de femme effectuées en suivant les techniques ci-dessus. On voit que conformément aux idées admises et ainsi que l'avait montré Guiraud [1], il existe bien dans le lait de femme un indosé apparent appréciable.

LAITS	(1)	(2)	(3)	(4)
gr. ‰				
Extrait sec	146.00	100 15	116.00	119.00
N total	3.46	3.00	3.40	3.90
N résiduel	0.30	0.26	0.40	0.28
N peptidique	3.16	2.74	3.00	3 62
Caseïne	19.75	17 12	18.75	22.62
Beurre	47.00	17.00	29.00	30.00
Lactose (Sucres réducteurs exprimés en..)	72.20	61.00	60.00	58.00
Cendres	1.95	1 50	2 00	2.20
Somme des substances dosées	140.90	96.62	109.75	112.82
Indosé	5.10	3.53	6.25	6.18

N.B.— Ces laits provenaient de nourrices saines dont les enfants étaient âgés de 6 à 8 mois.

B. - L'anomalie optique du lait de femme

On sait que la déviation d'un lactosérum de femme observé au polarimètre est inférieure à celle que l'on peut calculer à partir du lactose dosé.

Esbach [1] a étudié le premier l'anomalie optique du lait de femme, qu'il explique de la façon suivante :

« Le lait ne contient pas qu'une seule et unique lacto-

« se, la lactose-type que nous retirons par cristallisa-
« tions fractionnées du lait de vache. Il y a dans chaque
« lait un mélange de lactoses dont les propriétés très
« différentes se révèlent avec évidence quand on étudie
« comparativement le lait de vache (le plus régulière-
« ment composé) et le lait de femme qui est le plus irré-
« gulièrement composé à ce point de vue. Portez à l'é-
« bullition avec un peu d'acide chlorhydrique les lactoses
« extraites des laits étudiés (femme, anesse) et vous les
« transformerez immédiatement en une seule, la plus
« fixe, la plus résistante, en lactose-type de vache, celle
« qu'on obtient pure par cristallisations répétées de la
« lactose du commerce, celle en un mot qui occupe les
« observateurs. Avec un sérum bien préparé, au mercu-
« re, par exemple, le dosage polarimétrique pourrait de-
« venir sérieux, en place des erreurs énormes qui se
« commettaient avec cet instrument ».

A première vue, il semble difficile d'admettre sur la simple foi de l'affimation d'Esbach, que le chauffage avec HCl, sans autres précautions de température et de concentration, fasse disparaître l'anomalie optique du lait de femme. Cette opération augmente sans aucun doute le pouvoir rotatoire, mais cette augmentation peut tout aussi bien venir de l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose.

Denigès [1] a traduit quantitativement cette assertion d'Esbach, puisqu'il conclut de ses expériences que « si la
« rotation imprimée au plan de polarisation est plus fai-
« ble pour les sérums de lait de femme que pour les
« solutions de lactose de même pouvoir réducteur que
« ces sérums, après hydratation à l'autoclave par les
« acides minéraux, *les nouvelles rotations deviennent*
« *égales*, et que les pouvoirs réducteurs augmentent
« dans les deux cas d'une quantité identique ».

Voyons comment il est possible d'interpréter ces résultats, en admettant ces conclusions :

D'abord, il faut éliminer la présence à côté du lactose, de dérivés glucidiques lévogyres non réducteurs, dont l'hydrolyse augmenterait le pouvoir réducteur de la solution, d'une quantité supérieure à celle qui correspondrait au lactose. Les seules hypothèses que l'on pourrait envisager seraient :

1°) l'existence dans le lait de femme du lactose sous une forme spéciale, ou d'un équilibre particulier entre plusieurs formes de lactose ;

2°) la combinaison, totale ou partielle, du lactose avec des dérivés azotés, par exemple, qui abaisseraient le pouvoir rotatoire, et qui en raison de leur hydrolyse facile conserveraient le pouvoir réducteur du lactose ;

3°) la présence d'un composé lévogyre que racémiserait ou détruirait la chauffe à l'autoclave.

Examinons ces hypothèses à la lumière des connaissances acquises jusqu'à ce jour.

Les deux formes du lactose étudiées par Tanret [1] ($\alpha \rightleftarrows \beta$) n'épuisent pas toutes les possibilités que laisse prévoir sa formule et peut-être n'est-il pas superflu de rappeler à ce sujet les conceptions actuelles sur les différentes formes de sucre (1).

On admet, pour le glucose, par exemple, considéré sous sa forme stable (1,4 Tollens [1], 1,5 Haworth).

l'existence de deux formes différentes par leur pouvoir rotatoire et qu'on représente par la position différente

(1) Pour la rédaction de ce qui suit nous avons fait de fréquents emprunts à Cramer. Les sucres et leurs dérivés. Dom. Edit.

de l'H et de l'OH du groupe pseudoaldéhydique. Ces formes sont dénommées α et β et ce sont elles qui produisent la mutarotation. Mais on a pu préparer des dérivés du glucose autres que ceux qui viennent des formes α et β et que l'on a appelés dérivés γ ou mieux dérivés de la forme instable. Ces composés ne sont pas des dérivés stereoisomères optiques des formes α et β, mais des isomères de structure possédant un cycle oxydique différent du sucre dont ils dérivent sous leur forme stable.

De l'état actuel de nos connaissances sur les dérivés des formes instables, on peut considérer comme acquises les règles suivantes : Pour les sucres eux-mêmes, une seule forme est stable « in vitro ». Les formes instables ne peuvent être isolées que sous la forme de glucosides ou de dérivés où les hydroxyles alcooliques sont substitués empêchant ainsi la migration du cycle.

Néanmoins, ceci ne doit être jugé que comme une première approximation et le fait de considérer à priori comme instables les sucres différents de la forme normale a déjà reçu une première atteinte depuis que l'on a décrit un autre glucose suffisamment stable pour être isolé et différent du glucose ordinaire (Pringsheim et Kolodny [1]).

Si nous revenons au lait de femme, nous voyons que si le fait de posséder au sortir du sein un pouvoir rotatoire qui ne variera pas avec le temps de conservation, ne s'accorde pas avec l'hypothèse d'une forme de mutarotation du lactose normal, il n'est nullement incompatible avec l'existence d'une autre forme de lactose.

Il est d'ailleurs d'autant plus normal de poursuivre des recherches dans ce sens, que la présence de glucose instable a été rendue très probable dans l'organisme humain et que l'on n'est pas actuellement très éloigné de

croire que son importance biologique dépasse de beaucoup celle du glucose normal (Lundsgaard [1] à [4]).

D'autre part, la stabilité du pouvoir rotatoire du lait de femme ne peut pas suffire à réfuter d'emblée l'hypothèse d'une forme anormale du lactose, puisqu'on sait que ces formes sont stables à l'état de glucosides; or le lactose est précisément un galactoside.

Examinons maintenant la deuxième hypothèse que nous avons envisagée, à savoir la combinaison totale ou partielle du lactose avec des composés azotés, tels que l'urée et les acides aminés par exemple. De pareils dérivés sont en effet connus. Le lactose uréide (Schoorl [1]) a un pouvoir rotatoire bien inférieur à celui du lactose, et on a d'autre part signalé des combinaisons des sucres avec l'alanine s'effectuant très facilement. De plus, on sait que les acides aminés et en particulier la leucine, jouent un rôle important dans la genèse du lactose (Hesse [1]).

La troisième hypothèse — présence de dérivés lévogyres que détruirait la chauffe à l'autoclave — ne nécessite pas de développements complémentaires.

On voit qu'en s'en tenant aux expériences antérieures, l'anomalie optique du lait de femme reste loin d'être expliquée.

Chapitre III

Considérations sur la nature de l'indosé du lait de femme

Nous avons jusqu'ici envisagé séparément l'anomalie optique du lait de femme d'une part, et la présence d'un « non dosé » d'autre part, mais il paraissait plus logique de rapprocher ces deux faits, et de chercher dans la nature de l'indosé l'explication de l'anomalie optique.

Si l'on s'en tient aux expériences de Denigès, il n'est pas possible d'attribuer à l'indosé un caractère glucidique, puisque dans ce cas les lactosérums hydrolysés seraient plus réducteurs que les solutions de lactose témoins.

Le caractère lipidique du non dosé étant peu vraisemblable, on était tenté d'expliquer à la fois le défaut de pouvoir rotatoire et l'indosé par la présence de matières azotées lévogyres.

Mais Denigès a déjà montré que la petite quantité d'azote restant après défécation à l'acétate de mercure rendait cette hypothèse bien improbable.

Nous avons également dosé l'azote restant après défécation par différents réactifs et n'en avons jamais trouvé que des quantités minimes.

AGENT DE DÉFÉCATION	AZOTE RESTANT ‰	
	I	II
Acide silicotungstique	0.35	0.20
— phosphotungstique	0.37	0.24
— métaphosphorique	0.39	7.26
— Tungstique	0 39	0.24
Alcool à 96°	0 40	0.20

Cet azote restant est constitué en majeure partie par l'azote de l'urée, qui se trouve dans le lait à une concentration voisine de celle du sang, et par des quantités infimes d'azote venant de l'acide urique, de la créatinine, etc....

Nous nous sommes contenté de doser dans certains faits, l'azote restant après défécation à l'acide silicotungstique, et l'urée (méthode au xanthydrol après défécation au Tanret).

	1	2	3	4	5
Lactose anhydre	72.60‰	69 75‰	70.20‰	73.90‰	69.30‰
α_D calculé d'après le lactose	7°98	7°67	7°72	8°12	7°62
α_D lu	7°05	6°30	6°30	7°	6°65
Azote de l'urée	0 12	0.13	0 09	0.25	0.06
Azote total	0.19	0.23	0 18	0.40	0 21
Azote indosé	0.07	0.10	0.09	0.15	0.15

On voit que pour expliquer la moyenne de 5 grs d'indosé par une matière azotée, il faudrait admettre qu'elle ne contient tout au plus que 0 gr. 15 pour 5 gr. (3 %), ce qui est assez improbable.

Il est vrai que des matières azotées peuvent se combiner au lactose et abaisser son pouvoir rotatoire sans modifier son pouvoir réducteur.

On sait, en effet, que le lactose uréide par exemple ne possède qu'un très faible pouvoir rotatoire, et il est possible que des acides aminés à longue chaîne et contenant peu d'azote se combinent au lactose pour donner des composés lévogyres.

Nous avions cru un instant pouvoir apporter un argument en faveur de l'union possible du lactose avec des acides aminés à la suite du fait expérimental suivant : Si dans un lactosérum de femme on dose l'azote aminé par la méthode de Sörensen, on n'en trouve que des traces infimes et souvent même une quantité nulle, tandis qu'en effectuant sur ce lactosérum une hydrolyse à l'autoclave ,on trouve que l'Az au formol est alors bien supérieur à la quantité provenant de la transformation de l'azote uréique en azote ammoniacal.

Mais le lait de vache se conduit de façon identique et Pichon-Vendeuil [1] a signalé que l'« Azote au formol » du lait de vache était nul. Cependant, cet auteur a retiré une certaine quantité d'acides aminés dont l'enchaînement est encore assez mystérieux.

Le rôle des matières azotées dans les anomalies du lait de femme paraît donc très secondaire.

Ces considérations permettent difficilement de se faire une idée de la nature de l'indosé puisqu'il faut rejeter à la fois sa nature glucidique, lipidique ou azotée.

Aussi, comme les conclusions contradictoires auxquelles nous arrivons sont conditionnées uniquement par les expériences de Denigès qui attribuent un même pouvoir réducteur aux lactosérums hydrolysés et aux solutions de lactose témoins, nous avons repris ces déterminations fondamentales.

Chapitre IV

Le lactoserum de femme

Nous avons rassemblé dans ce chapitre les caractéristiques d'un certain nombre de lactosérums de femme considérés au point de vue de leurs pouvoirs rotatoire et réducteur avant et après hydrolyse.

A.- Pouvoirs rotatoire et réducteur du lactoserum.

	LAITS COLOSTRAUX							LAITS PROPREMENT DITS			
Pouv. red. exprimé en Lactose	65,30	52,50	67.60	63,5	64	65	60,40	70,5	69,75	70,20	73,90
α_D lu et rapporté aux glucides totaux	44°	44°	42°	43°	42°	40°	37°	48°	45°	44°	47°

L'[α_D] calculé d'après le pouvoir réducteur, varie dans d'assez larges limites (+ 37° à + 47°). Cependant en moyenne, les laits colostraux possèdent un [α_D] inférieur à celui des laits proprement dits.

B. - Action des différents acides sur le lactoserum de femme

I) *ACTION DES ACIDES FORTS.*

On sait qu'une solution de lactose soumise à l'action hydrolysante des acides dilués voit son pouvoir réducteur augmenter dans la proportion de 100 à 140, tandis que son pouvoir rotatoire se trouve multiplié par 1,26.

Nous allons comparer à ces valeurs les résultats de l'hydrolyse totale de lactosérums de femme obtenus par défécation à l'aide de l'acide silicotungstique. Il ressort en effet des recherches de Pichon-Vendeuil [1] que ce réactif ne laisse persister que très peu de matières azotées. D'autre part, employé aux concentrations que nous indiquons, il donne un filtrat immédiatement clair et qui reste longtemps limpide, tandis qu'avec les acides tungstique et métaphosphorique on obtient souvent des liqueurs troubles, et qu'avec l'acide phosphotungstique il se développe tardivement une coloration bleue.

Le lait est déféqué de la façon suivante :

Acide silicotungstique à 5 %	5 cm³
Lait.	5 cm³
H^2O qsp	25 cm³
Filtrer.	

1°) On détermine le pouvoir réducteur du filtrat sur 2 cm³. On hydrolyse 2 autres cm³ par 1 cm³ d'HCl concentré additionné de 17 cm³ d'eau. Le liquide est maintenu à l'ébullition au réfrigérant ascendant pendant une heure, et le dosage des sucres est effectué par la méthode de Bertrand (après addition de 1 cm³ 3 de lessive de soude) dans la fiole même où s'est effectuée l'hydrolyse.

LAITS	Sucres réducteurs dosés par la méthode de Bertrand exprimé en cm³ de MnO^4K à 5‰		RAPPORT de cuivre ρ
	AVANT HYDROLYSE	APRÈS HYDROLYSE	
(1)	3.90 — 3.85	5.95 — 6	1.55
(2)	3.65 — 3.65	5.65 — 5.60	1 54
(3)	4.50 — 4.55	7.20 — 7.25	1.61
(4)	4.20 — 4.25	6.40 — 6.50	1.54
(5)	3.65 — 3 60	5.65 — 5 70	1.58
(6)	2.90 — 3.00	4 65 — 4 70	1.62
(7)	3.40 — 3.45	5.05 — 5 10	1.50
(8)	3.90 — 3.90	6.65 — 6 65	1.47

2°) La détermination du pouvoir rotatoire après hydrolyse est rendue difficile par le noircissement des liqueurs sous l'action des acides forts. Il est nécessaire de clarifier à plusieurs reprises à l'aide de noir animal qui est susceptible d'enlever une certaine quantité de sucre.

Nous donnons néanmoins les résultats de quelques-unes de ces expériences en rappelant qu'ils sont entachés de cette erreur systématique.

Pouvoir réducteur exprimé en lactose anhydre ‰	POUVOIR ROTATOIRE			
	AVANT HYDROLYSE		APRÈS HYDROLYSE	
	α_D lu	α_D calculé d'après le lactose	α_D lu	α_D calculé
64.70	6	7.15	8.40	9
71	6.80	7.85	9.26	9.89
72.25	6 86	7.99	9.66	10.06
73.40	7.16	8.11	9.50	10.21

Ces essais permettent de conclure :

1°) Que le rapport des poids de cuivre fournis lors de la réduction de la liqueur de Bertrand par un lactosérum de femme avant et après hydrolyse, est supérieur à celui qu'on obtiendrait en partant d'une solution de lactose pur.

2°) Que le pouvoir rotatoire après hydrolyse reste inférieur à celui que possèderait une solution témoin de lactose, de même pouvoir réducteur, hydrolysée dans les mêmes conditions.

II) *ACTION DE L'ACIDE ACETIQUE.*

Une solution de lactose bouillie une demi-heure avec de l'acide acétique à 1/20 n'est pas altérée. On retrouve les pouvoirs réducteur et rotatoire initiaux. Il n'en est pas de même du lactosérum de femme.

Pour effectuer une hydrolyse acétique sur des lactosérums préparés par défécation à l'aide de l'acide silicotungstique, on élève d'abord le pH de la solution par addition d'un petit cristal d'acétate de soude et on ajoute ensuite 1/20 du volume d'acide acétique cristallisable. Le liquide est porté à l'ébullition pendant une demi-heure.

LACTOSERUM	AVANT HYDROLYSE		APRÈS HYDROLYSE ACETIQUE	
	αD	POUV. RED.(1)	αD	POUV. RED.
1	1.10	3.6	1.20	3.9
2	1.30	4.50	1.40	4.7

(1). Pouv. red. exprimé en cm³ de MnO^4K à 5 ‰

III) *ACTION DE L'ACIDE BENZENE-SULFONIQUE*

Nous avons employé l'acide benzène-sulfonique N/40.

	SOLUTION DE LACTOSE HYDRATÉ A 51.6 ‰		SOLUTION GLUCIDIQUE VENANT D'UN LAIT DE FEMME	
	α_D	Pouv. réd. en cm^3 de Mno^4 K à 10.26 de Cu ‰	α_D	Pouvoir réducteur
Avant hydrolyse	5°40	6.45	3°60	5 9
Après ébullition avec acide benzène sulf N/40				
1/2 heure	5°45	6.45	3°82	5.9
1 heure	5°42	6.45	4°12	6.05
2 heures	5°62	6.60	4°16	6.20

Nous constatons d'abord que l'augmentation de pouvoir réducteur est plus forte pour les lactosérums que pour les solutions de lactose.

D'autre part, le pouvoir rotatoire s'accroît de 6 % au bout d'une demi-heure et de 14 % en une heure, tandis que l'α_D de la solution de lactose reste fixe et n'atteint 4 % qu'au bout de deux heures.

Il nous est déjà permis d'assurer qu'une partie des glucides du lactosérum de femme n'est pas du lactose ordinaire, les acides faibles y déterminant facilement une hydrolyse partielle et les expériences d'hydrolyse totale permettent en outre d'attribuer une nature glucidique à la majeure partie du non dosé.

CHAPITRE V

Essais d'isolement de la substance levogyre du lait de femme

L'étude du lactosérum ne nous donnant aucune certitude quant à la nature de la « substance lévogyre » du lait de femme, nous avons tenté de l'isoler. Dans notre hâte à obtenir un enrichissement rapide nous avons primitivement négligé la cristallisation fractionnée, longue et pénible, et nous avons eu recours à des techniques moins classiques.

La substance lévogyre du lait de femme, supposée non réductrice, ne devant pas donner d'osazone, nous avions cru pouvoir enlever le lactose à l'état de lactosazone. Mais nous avons abandonné ce procédé pour les raisons suivantes: Si on traite une solution de lactose par la phénylhydrazine, on constate qu'après cristallisation de l'osazone, les eaux mères sont nettement lévogyres. Ceci aurait gêné considérablement l'interprétation des lectures polarimétriques. D'autre part, la phénylhydrazine étant réductrice, il était nécessaire pour effectuer des dosages de sucres, d'en priver la liqueur par de laborieuses extractions à l'éther. Ces extractions devaient naturellement s'effectuer en milieu alcalin qui, comme on le sait,

altère rapidement les sucres et modifie leur pouvoir rotatoire. Enfin, la lactosazone qui reste dissoute réduit, elle-même, la liqueur de Fehling et donne par hydrolyse des produits variés, réducteurs et actifs. Aussi cet essai d'isolement ne nous a procuré que des déboires. Nous devions par la suite, d'ailleurs, reconnaître que la base théorique de cette séparation était erronée.

Nous nous sommes ensuite adressé à la fermentation lactique dans l'espoir de nous débarrasser ainsi de la majeure partie du lactose.

250 cm^3 de lait de femme abandonnés à la fermentation lactique à 30°-35°, en présence d'un excès de CO^3Ca pendant trois semaines, sont ensuite déféqués à l'alcool fort. Le filtrat est ramené par distillation de l'alcool à environ 30 cm^3 et refroidi. La majeure partie du lactate de chaux cristallisé. On filtre et on étend la liqueur à un volume connu.

SUCRES RÉDUCTEURS, MÉTHODE DE BERTRAND EN CUIVRE RAPPORTÉ AU LITRE		RAPPORT DE CUIVRE
AVANT HYDROLYSE	APRÈS HYDROLYSE	
18.25	36.02	$\rho = 1.97$
13 25	27 80	$\rho = 2.09$

L'augmentation du pouvoir réducteur par hydrolyse est, on le voit, supérieure (et de beaucoup) à la transformation du lactose en glucose et galactose, et si nous pouvions interpréter ces résultats en toute sécurité, nous serions amené à admettre la présence dans le lait de femme d'un glucide non réducteur ou moins réducteur que le lactose.

Mais en raison de l'obscurité des phénomènes fermentaires, ces expériences sont sujettes à caution. On pourrait objecter en effet que la synthèse sous l'influence de la fermentation de dérivés non réducteurs libérant du sucre par hydrolyse, n'est pas impossible. Aussi, avons-nous répété sur du lait de vache les mêmes expériences de fermentation. Par trois fois, nous avons obtenu une liqueur — non réductrice — et qui ne le devenait pas après hydrolyse. Cependant, ces expériences n'étaient pas absolument identiques à celles effectuées sur le lait de femme, car dans le cas du lait de vache tout pouvoir réducteur avait disparu et on pouvait alors objecter que le ferment lactique, après avoir épuisé les aliments glucidiques libres pouvait détruire tout le sucre « combiné », d'où la disparition totale du pouvoir réducteur, même après hydrolyse — hypothèse peu probable, mais qui nous a paru suffisante pour nous empêcher de conclure. Richaud et Coirre [1], en étudiant l'action des ferments intestinaux sur certains sucres, n'émettent-ils pas l'hypothèse analogue d'une combinaison possible entre les sucres et les protides, combinaison que son instabilité ne mettrait pas à l'abri de la destruction par la levure. De plus, la présence, dans nos solutions finales, d'une assez forte quantité de peptone, que n'enlève pas la défécation à l'alcool, peut influer sur les dosages de sucre. On sait, en effet, que les dérivés peptidiques s'opposent à la « floculation » de l'oxyde de cuivre, d'où une erreur par défaut dans le dosage. Après hydrolyse, par contre, les peptones ayant fait place à des molécules plus petites, la floculation s'effectue plus normalement.

En résumé, les essais d'isolement de la substance lévogyre à l'aide de la fermentation lactique mettent en jeu des phénomènes trop complexes pour permettre d'en in-

terpréter les résultats simplement et en toute sécurité. Ils nous auront cependant donné une précieuse indication sur l'existence probable d'un glucide ayant un pouvoir réducteur inférieur au lactose. Aussi sommes-nous revenus aux méthodes d'enrichissement du lactosérum en substance lévogyre au moyen de la cristallisation fractionnée.

Nous ne nous attarderons pas à décrire dans le détail les premières techniques que nous avons suivies dans l'isolement de ce glucide. Il nous suffira de dire que nous avons opéré des cristallisations fractionnées dans l'alcool éthylique ou dans un mélange d'alcools méthylique et éthylique.

1° 300 cm³ de lait ont donné un lactosérum dont, après sept cristallisations dans l'alcool à 60°, les eaux-mères évaporées, ont laissé un résidu qui a été épuisé par l'alcool méthylique bouillant. La solution méthylique donne par évaporation 0,6725 d'un produit d'$[\alpha_D] = -5°$. Ce produit recristallisé dans un mélange d'alcools méthylique et éthylique a donné 0,081 de cristaux qu'on a dissous dans 15 cm³.

$[\alpha_D] = -14°$.

Sucres réducteurs après hydrolyse exprimés en galactose ..... 5 gr. 04 0/00

Extrait sec ..... 5 gr. 40

Rapport de cuivre ρ 4,65/2,25 206

N total = 0,09 0/00.

2°) Après trois cristallisations à partir de 300 cm³ de lait, évaporation des eaux-mères, extraction méthylique, puis cristallisation dans un mélange d'alcools méthylique et éthylique.

0 gr. 225 de cristaux dans 20 cm^3 d'eau [11 gr. 2 0/00]
[α_D] = — 7°.
Rapport de cuivre = 3,80/11,95 = 1,92.
N total = 0,121 0/00.

Ces opérations nous amenaient donc à un mélange légèrement lévogyre, beaucoup moins réducteur que le lactose et contenant encore une petite quantité d'azote venant vraisemblablement de protides entraînés.

C'est en voulant enlever cet azote par le tanin acétique et en neutralisant par CO^3Ca les liqueurs acides qui en résultaient, que nous nous sommes rendu compte du danger de laisser les sucres en milieu alcalin, ne le fût-il que légèrement.

Si donc nos premiers essais de cristallisation ne nous ont donné que de médiocres résultats, eu égard au labeur qu'ils ont exigé, ils ont néanmoins guidé vers une technique plus rationnelle d'isolement des glucides du lait, technique que nous exposerons ultérieurement (Chapitre X).

Chapitre VI

Les glucides du lait de femme sont réducteurs

Avant d'exposer les résultats auxquels nous a conduit cette technique, nous développerons les arguments qui plaident en faveur de la présence dans le lait de femme d'un ou de plusieurs glucides réducteurs.

Rappelons d'abord que la nature glucidique de la substance inconnue est prouvée par le fait que le rapport de cuivre ρ est plus grand pour les lactosérums de femme que pour les solutions de lactose.

Ceci étant admis, deux hypothèses restent plausibles: ou bien cette substance glucidique n'est pas réductrice et dans ce cas elle est nécessairement lévogyre, ou bien elle est réductrice et il suffit dès lors qu'elle soit moins dextrogyre que le lactose. Les expériences qui suivent nous paraissent indiquer le caractère réducteur du glucide inconnu.

1°) Considérons dans un lactosérum de femme: l'extrait sec, les sucres réducteurs exprimés en lactose, α_D lu et calculé et admettons dans une première approximation que la différence entre le poids du lactose et l'ex-

trait sec soit proportionnelle à la quantité de substance lévogyre. Nous pouvons calculer à l'aide de ces données le pouvoir rotatoire spécifique des matériaux fixes du lait et celui de la substance lévogyre supposée non réductrice.

	Extrait sec	Lactose	α_D calc.	α_D lu	$[\alpha_D]$ des substances dissoutes	$[\alpha_D]$ de l'inconnu
				—	—	—
	100	93,1	10,24	8,29	41°	—140°
Après un premier enrichissement	100	86,1	9,47	7,28	36°	— 76°
Après un second enrichissement	100	68,7	7,55	2,35	11°	— 9°

Ce tableau nous montre que si l'on suppose que le lactose est le seul sucre réducteur, la substance lévogyre non réductrice constituant la plus grande partie de l'indosé, on arrive à cette conclusion paradoxale que l'enrichissement de la solution en produit lévogyre (α_D passant de + 41° à + 11°) s'accompagne d'une diminution du pouvoir rotatoire spécifique de l'indosé. L'erreur provient de ce que nous avons supposé à tort la substance lévogyre non réductrice.

2°) On sait que les sucres réducteurs tels que l'arabinose, le glucose, le lévulose, le lactose chauffés avec H^2O^2 en milieu alcalin et en présence de MnO^2, pendant 45 minutes au bain-marie, perdent successivement leurs pouvoirs rotatoire et réducteur. Un tel traitement laisse inaltérés les glucides non réducteurs, et en particulier le saccharose. Après avoir vérifié l'exactitude de ce fait, nous avons ainsi traité un lactosérum de femme après défécation à l'alcool et au tanin acétique.

	Lactosérum avant traitement par H_2O_2	Lactosérum après traitement par H_2O_2
	—	—
α_D lu	2°50	0°05
Pouvoir réducteur (en lactose)	29,50	0,50
α_D calculé	3°21	0°06

Il y a donc disparition presque complète des pouvoirs rotatoire et réducteur, d'où probabilité d'un glucide réducteur.

3°) Après avoir mesuré le pouvoir réducteur d'un lactosérum de femme vis-à-vis des liqueurs cupriques, nous avons préparé une solution de lactose pur de même pouvoir réducteur vis-à-vis des mêmes liqueurs. Dans ces deux solutions, les sucres furent ensuite dosés au moyen de l'oxydation par l'iode, méthode dans laquelle intervient le poids moléculaire du glucide analysé. Si tout le pouvoir réducteur du lait de femme est dû uniquement au lactose, les deux liqueurs se comporteront de la même façon vis-à-vis de l'iode, tandis qu'une discordance entre les dosages au Bertrand et à l'iode prouvera le caractère réducteur du glucide inconnu. Nous avons effectué ces dosages sur une solution préalablement enrichie en substance lévogyre et nos résultats mettent en évidence une discordance nette.

	Lactosérum	Solution de lactose
Lactose hydraté (au Bertrand)..	26,40 gr. p. 1000	26,40 gr. p. 1000
α_D lu.	0°80	2°75
Lactose à l'iode	20,36 gr.	26,64 gr.

Ces présomptions ont d'ailleurs été confirmées dans la suite par l'étude des glucides isolés à l'état pur.

CHAPITRE VII

Un nouveau glucide du lait de femme
Le Gynolactose

Rappelons tout d'abord que nous désignons par la lettre ρ le rapport des poids de cuivre fournis lors de la réduction de la liqueur de Bertrand par une solution d'un glucide quelconque après et avant hydrolyse totale (1).

La détermination de ce rapport donne une mesure indirecte du pouvoir réducteur d'un glucide. En effet, après hydrolyse totale, une liqueur sucrée ne contient que des hexoses qui possèdent à peu près tous le même pouvoir réducteur, si bien qu'après hydrolyse tous les glucides ont le même pouvoir réducteur. On conçoit donc que plus $\rho \left(\frac{\text{Cuivre après hydrolyse.}}{\text{Cuivre avant hydrolyse}}\right)$ est grand, le numérateur étant constant, plus le dénominateur doit être petit, autrement dit moins le sucre est réducteur.

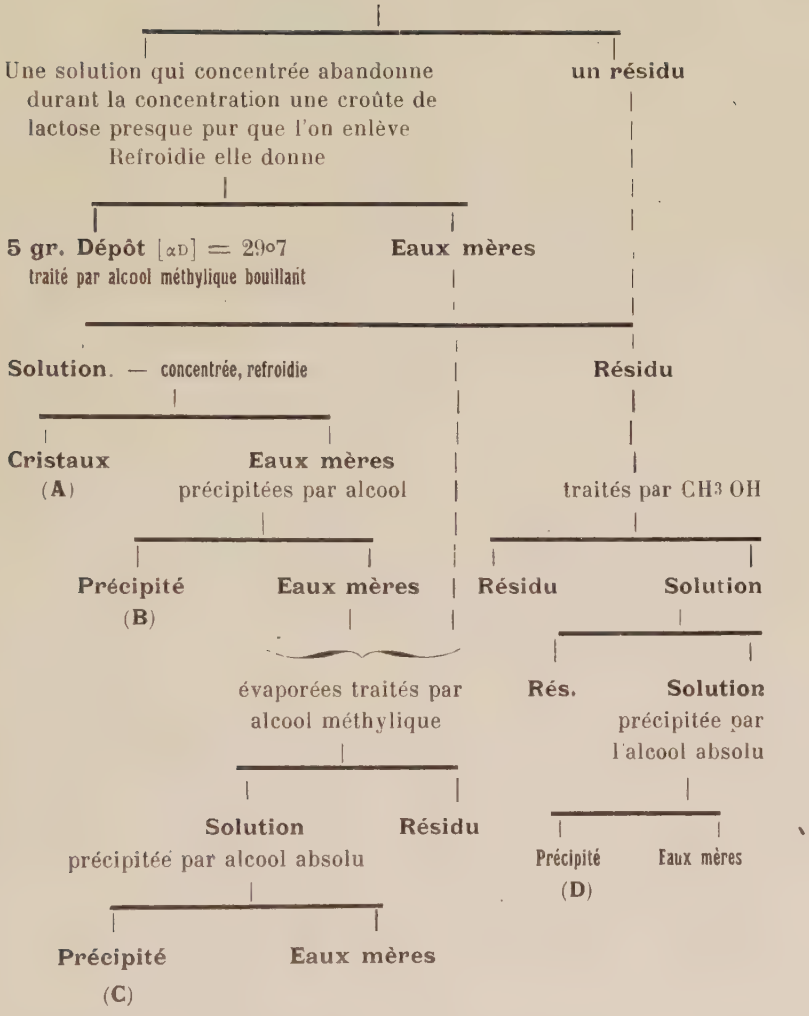
(1) Cette valeur ρ n'est évidemment que la moyenne des rapports de Cu qui dépendent légèrement de la concentration en sucre des solutions étudiées.

La destruction partielle de certains hexoses au cours de l'hydrolyse peut cependant parfois enlever toute rigueur à cette mesure indirecte du pouvoir réducteur initial.

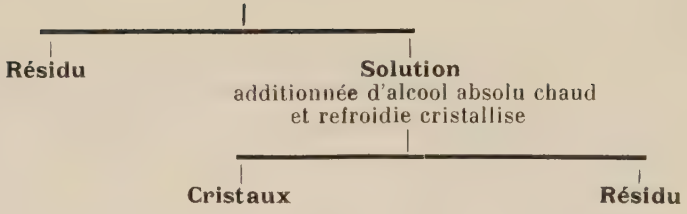
Nous ne décrirons pas ici toutes nos expériences. Un tel exposé ne présenterait qu'un intérêt médiocre puisque toutes nous ont conduit aux mêmes résultats. Nous nous permettrons toutefois de signaler que nous avons effectué une dizaine d'expériences semblables à celles que nous allons décrire et que chacune nécessite environ une centaine de déterminations polarimétriques et plusieurs centaines de dosages de sucres (avant et après hydrolyse). D'autre part, les cristallisations des sucres étant toujours délicates, les évaporations nécessitant l'emploi du vide et ne pouvant s'effectuer qu'à des températures peu élevées, certaines opérations nous ont demandé plus d'un mois de labeur soutenu.

Expérience I. — 500 cm^3 de lait déféqués à l'alcool, concentrés, dégraissés (1), donnent une solution qu'on évapore et dessèche dans le vide. La poudre obtenue, traitée par l'alcool méthylique bouillant, donne :

(1) Voir le détail de ces opérations au Chapitre X.



Les produits A, B, C, D rassemblés, fournissent environ 1 gr. 50 de produit d'[αD] compris entre 0° et 5°. On les traite par l'alcool méthylique bouillant.



I. 0 gr. 14 (pas entièrement secs)
Repris en solution à 7 ‰
α_D légèrement levogyre (-2°)
Rapport de cuivre 208
Sucres après hydrolyse
exprimé a) en glucose 6.10 ‰
b) en galactose 6.40 ‰
Azote total 0 gr. 07 ‰

Cette expérience confirme donc la présence dans le lait de femme d'un composé glucidique légèrement lévogyre et beaucoup moins réducteur que le lactose.

Expérience II. — Cette expérience a été effectuée sur le mélange des trois laits suivants :

	I	II	III
Volume	1.500 cm³	215 cm³	850 cm³
Lactose	65.30	32 50	67.60
α_D) exprimé d'après le pouvoir réducteur exp en lactose.	+ 44°	+ 44°	+ 42°
Rapport de cuivre	1.55	1.56	1.55

Ces trois laits donnent, après défécation à l'alcool, puis traitement à l'éther et à l'éther de pétrole, 640 gr. d'une liqueur claire qui, diluée au 1/5, présente les caractères analytiques suivants :

TABLEAU A

Les 50 grs de cristaux obtenus présentaient les caractères analytiques suivants : $[\alpha_D] = + 38°$, $\rho = 1{,}51$

On les traite par de l'alcool méthylique bouillant et on obtient.

- une **solution**
- et un **résidu** $[\alpha_D] = + 46°$ qui est traité de nouveau par l'alcool méthylique bouillant
  - **Solution**
  - **Résidu** $[\alpha_D] = + 50°$ de nouveau bouilli avec de l'alcool méthylique
    - **Solution**
    - **Résidu** $[\alpha_D] = + 50°$

Ces solutions méthyliques sont rassemblées et concentrées, pendant la concentration il se dépose des cristaux

- **Cristaux** $[\alpha_D] = 27$, $\rho = 1{,}70$ traités par l'alcool méthylique à l'ébullition
  - **Résidu**
  - **Solution** (1)
    - **Résidu** $[\alpha_D] = + 43°$, $\rho = 1{,}48$
    - **Solution** (2)
- **Eaux mères** évaporées à siccité, le résidu est repris par de l'alcool éthylique froid
  - **Résidu** (5 gr. 80) bouilli avec de l'alcool méthylique
    - **Résidu**
    - **Solution**
  - **Solution** évaporée donne 1 gr. 18 de produit (3) $[\alpha_D] = + 4°$, $\rho = 1{,}65$

Les solutions (1) (2) (3) rassemblées donnent après évaporation 4,70 de produit qu'on épuise par de l'alcool à 95°. — On obtient ainsi :

- **Solution** qu'on abandonne à la cristallisation
  - **Cristaux** (0,70) $[\alpha_D] = + 8°$, $\rho = 1{,}60$
  - **Eaux mères** $[\alpha_D] = + 12°$, $\rho = 1{,}61$
- **Résidu** traité par l'alcool méthylique froid
  - **Solution** $[\alpha_D] = + 1°20$, $\rho = 1{,}67$
  - **Résidu** $[\alpha_D] = - 4°$, $\rho = 1{,}84$

$\alpha_D = + 3°76.$

$[\alpha_D]$ calculé d'après le pouvoir réducteur exprimé en lactose $= + 41° 7.$

Rapport de cuivre, 9,35/ 6 = 155,8.

Cette solution est concentrée dans le vide additionnée d'alcool chaud et abandonnée à la cristallisation dans un mélange de glace et de sel. On obtient ainsi 29 gr. de cristaux constitués par du lactose presque pur :

$([\alpha_D] = + 54°, \rho = 1{,}42$ à $1{,}44).$

Les eaux-mères, de nouveau concentrées et additionnées d'alcool, sont abandonnées à la cristallisation. Les cristaux sont traités suivant le Tableau A et les eaux-mères suivant le Tableau B.

Nous attirerons ici l'attention sur ce fait que dans le Tableau B, nous retrouvons en G, G', G'' les rapports de cuivre voisins de 2,00. Or les produits G et G' sont les premiers cristaux obtenus par refroidissement d'une solution méthylique et G'' est même le résidu d'une extraction méthylique. Nous pouvons donc en déduire que le sucre nouveau, bien que plus soluble que le lactose dans l'alcool méthylique, n'y est cependant pas extrêmement soluble.

Pour le différencier du lactose ordinaire, commun à tous les lactosérums, nous avons donné le nom de *Gynolactose* (de γυνή femme) au sucre ainsi isolé.

Voici les caractères analytiques de quelques solutions riches en gynolactose :

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
Concentration des solutions étudiées en gr. ‰	5.40	47.30	7.00	10.75	8 40	13.50
Glucides totaux après hydrolyse exprimés						
a) en glucose	4.80	43.35	6.10	9 35	8.32	13.65
b) en galactose	5 07	45.50	6.40	9 90	8.80	14.40
(αD) calculé d'après l'extrait sec	— 9°20	— 12°	legt levog	—10°20	legt levog	— 12°
ρ	2.06	1.95	2.08	2.02	2 09	2.07

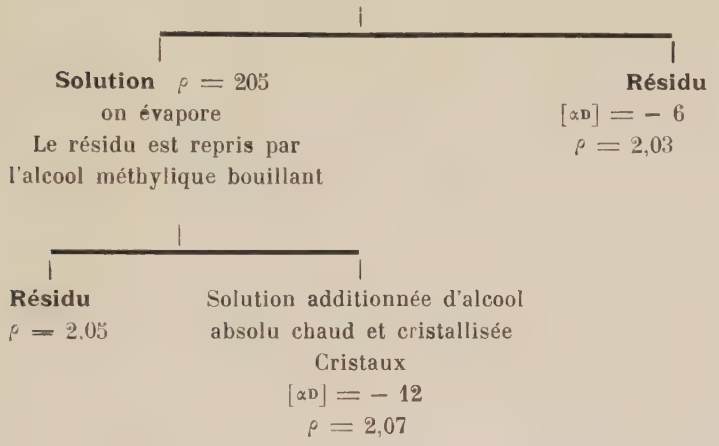
On est donc en droit d'accorder au gynolactose un pouvoir rotatoire spécifique voisin de — 12° et un pouvoir réducteur vis-à-vis des liqueurs cupriques égal à un peu moins de la moitié de celui du glucose, soit à environ les 2/3 de celui du lactose.

Malgré les nombreuses recristallisations que nous avons fait subir à ce produit, nous ne pouvons pas assurer que nous ayons eu en mains un produit rigoureusement pur, ne contenant plus trace de lactose ou de tout autre composé du lactosérum. Il est même probable que le pouvoir rotatoire spécifique devra être rectifié dans la suite. Nos déterminations polarimétriques ont en effet été effectuées sur de petites quantités de substance, et les traces d'azote trouvées dans les liqueurs étudiées y laissent soupçonner la présence d'une petite quantité de dérivés protidiques capables d'influer sur le pouvoir rotatoire.

Il semble toutefois que les constantes que nous avons données soient assez proches de la réalité. En effet, la recristallisation du produit déjà légèrement lévogyre modifie peu les constantes initiales :

α_D légèrement lévogyre ($[\alpha_D] = -4°$ environ).
$\rho = 2{,}09$,

traité par l'alcool méthylique bouillant, donne :



Chapitre VIII

Le lactose et le gynolactose ne sont pas les seuls glucides du lait de femme

Après avoir isolé le gynolactose, nous avons été tenté d'expliquer mathématiquement toutes les anomalies du lait de femme au moyen des constantes du lactose et de celles de ce nouveau glucide. A première vue, il semblait que ce serait chose aisée, puisque le gynolactose étant lévogyre et beaucoup moins réducteur que le lactose, l'anomalie optique et l'indosé du lait de femme s'expliquaient du même coup.

Mais un examen plus approfondi nous montra que par la présence de lactose et de gynolactose seul, les constantes de certains laits ne s'expliquaient pas. Si nous essayons de calculer la teneur d'un lactosérum en gynolactose et en lactose en utilisant d'une part les pouvoirs rotatoires et d'autre part les pouvoirs réducteurs, nous n'arrivons en effet que rarement au même résultat.

Prenons pour constantes du gynolactose les valeurs probables de $[\alpha_D] = -10°$ et $\rho = 2{,}05$.

Dans un lait quelconque, le pouvoir réducteur après hydrolyse permet de connaître avec une approximation suffisante la concentration initiale en glucides, soit p, qui permet de calculer le pouvoir rotatoire spécifique du mélange glucidique, soit α. Sachant que l'$[\alpha_D]$ du lactose

est de + 55° et l'[α_D] du gynolactose [— 10°], on peut en déduire que la concentration en lactose est

$$\frac{p\ [a + 10]}{55 + 10}$$

Connaissant ainsi par des déterminations polarimétriques la concentration respective des deux sucres dans un lactosérum, on peut en déduire la valeur ρ.

D'une manière plus générale, si on désigne

par x la concentration 0/00 en lactose hydraté,
par y id. en gynolactose,
on a x + y = Sucres totaux = p (1),
et α_D (lu) $= \frac{55 \times 2 \times x}{1000} - \frac{10 \times 2 \times y}{1000}$

$1000 \times \alpha_D = 110\ x - 20\ y$ (2).

On tire facilement x et y de ces deux équations et les valeurs trouvées permettent de calculer ρ d'après l'équation : $x \times 1{,}40 + y \times 2{,}05 = \rho\ (x + y) = p\rho$.

Nous avons effectué ces calculs pour certains laits.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
α_D lu	3°76	2°60	1°10	1°30	1°15	1°46	1°33
Sucres en lactose	43.50	34.95	13.20	16.10	15.10	16 65	13.80
Sucres après hydrolyse exprimés							
a) en galactose	51.30	39.60	15.35	19.60	17.50	19 45	15 35
b) en glucose	49	38.25	14 55	18.60	16.70	18.45	14.60
(en grammes 0/00) c'est-à-dire environ	50	39	15	19	17	19	15
(α_D) spécifique du mélange glucidique	37°	33°	36°	34°	33°	38°	40°
Lactose calculé	36.10	25.8	10 6	12 8	11.2	14	11.5
ρ calculé	1.58	1.66	1.59	1.62	1.61	1.57	1.67
ρ trouvé	1.56	1.50	1.53	1.61	1.54	1 55	1.47

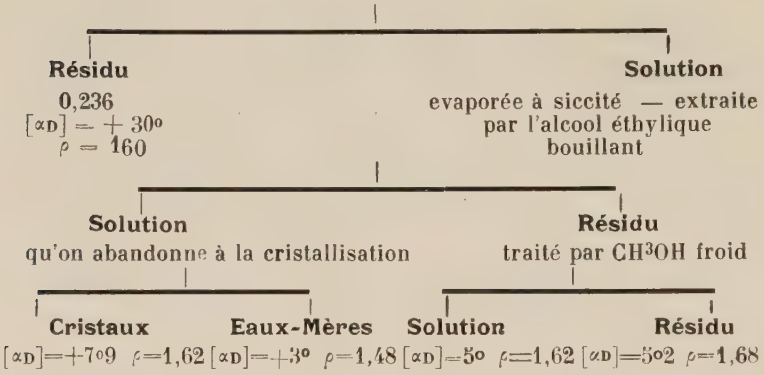
On voit que ρ calculé s'éloigne parfois sensiblement de ρ trouvé.

D'autre part si on examine les analyses des différentes fractions obtenues dans l'expérience II, on constate qu'il n'existe pas un rapport constant entre le pouvoir rotatoire spécifique et le rapport de cuivre. Si les mélanges glucidiques étudiés étaient toujours constitués par un mélange de lactose et de gynolactose, à un pouvoir réducteur donné devrait correspondre un même pouvoir rotatoire. Or on ne constate rien de semblable, puisque à ne considérer même que les produits dont le pouvoir rotatoire est voisin de 0°, on leur trouve des valeurs de ρ variant de 1,50 à 2,00.

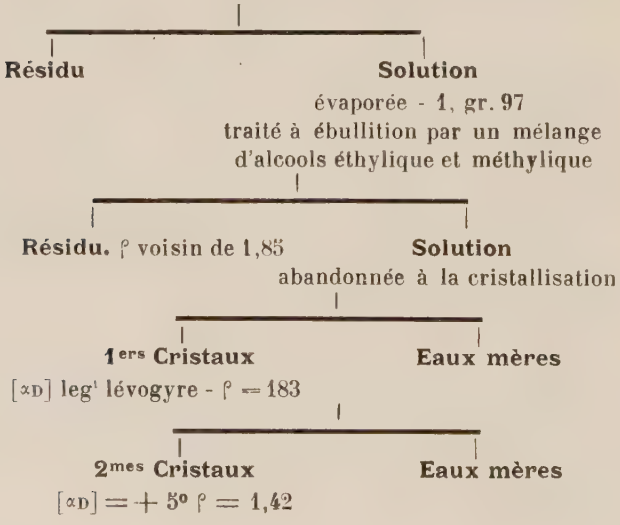
Ces anomalies nous ont amené à rechercher la présence d'un troisième glucide. Nous y avions été d'autant plus conduit que nous saisissions une différence appréciable de solubilité dans l'alcool méthylique entre des produits de pouvoir rotatoire assez voisin. Ceux dont le rapport de cuivre est voisin de 1,50 se montrent très solubles dans l'alcool méthylique froid, tandis que les autres (ρ voisin de 2) constitués en grande partie par du gynolactose, le sont beaucoup moins. Nous avons procédé à l'isolement de ce troisième glucide, mais en raison de sa grande solubilité dans l'alcool méthylique il donne dans ce solvant des liqueurs sirupeuses ne cristallisant que très difficilement et entraînant facilement les autres sucres et en particulier le gynolactose. Aussi la purification en est très malaisée.

Les analyses de produits obtenus en combinant les extractions à l'alcool méthylique froid, la précipitation par l'alcool éthylique et la recristallisation dans un mélange de ces deux solvants nous ont fourni les constantes suivantes.

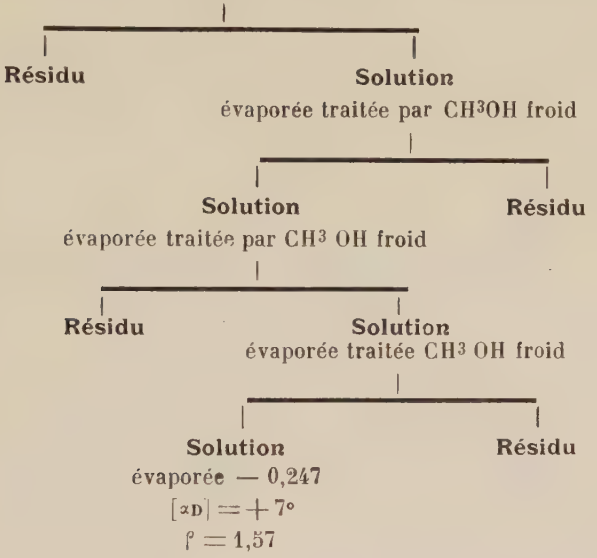
I) Solution méthylique de 2 gr. 75 environ de produit d'[α_D] voisin de [+ 10°] évaporée à sec. Le résidu est repris par l'alcool méthylique bouillant.



II) 200 cm^3 de lait déféqués, ainsi qu'il a été dit, donnent une liqueur qui évaporée à siccité, est ensuite *traitée à froid* par de l'alcool méthylique. La solution évaporée donne 3 gr. environ de résidu qu'on retraite par l'alcool méthylique.



III) Des résidus de solutions méthyliques sont rassemblés, séchés et traités par l'alcool méthylique.



Nous pourrions ici encore, multiplier les exemples, mais ils n'apporteraient pas de données nouvelles. Nous avons déjà dit qu'en raison même de sa plus grande solubilité dans l'alcool méthylique ce glucide était moins facilement purifiable que le gynolactose. C'est aussi avec les produits les plus solubles dans l'alcool méthylique que l'on rencontre le peu de caramel produit par les évaporations successives, l'acide lactique et les graisses qui ont échappé aux premiers traitements à l'éther et à l'éther de pétrole et tous ces produits gênent considérablement les purifications.

De toutes nos déterminations, il nous paraît cependant licite de déduire que, outre le lactose et le gynolactose, il existe dans le lait de femme un troisième glucide légèrement dextrogyre et de pouvoir réducteur voisin de celui du lactose.

Chapitre IX

Quelques propriétés des nouveaux glucides du lait de femme

Il ne pouvait être question d'entreprendre sur le peu de substance dont nous disposions une étude complète de la constitution des glucides isolés du lait de femme. Ce travail constituera une œuvre de longue haleine que nous entreprendrons dès que nous aurons obtenu une quantité suffisante de ces sucres. En voici cependant quelques propriétés :

Le glucide que nous avons appelé gynolactose, se présente sous forme de cristaux blancs, hygroscopiques fondant vers 205°, très solubles dans l'eau, très peu solubles dans l'alcool éthylique et dans l'acétone, plus solubles dans l'alcool méthylique chaud d'où on le cristallise par refroidissement.

Nous avons vu qu'on peut lui attribuer un pouvoir rotatoire spécifique de — 12° et un pouvoir réducteur égal à un peu moins de la moitié de celui du glucose, soit à environ les 2/3 de celui du lactose.

Le gynolactose ne semble pas présenter le phénomène de la mutarotation. Il est partiellement hydrolysé à chaud par les acides faibles.

Dosage au Bertrand en cm^3 de MnO^4K a 5 ‰		
AVANT HYDROLYSE	CHAUFFÉ A L'ÉBULLITION 1/2 heure avec CH^3COOH 1/20	Aprés hydrolyse totale
1 cm^3 6	1 cm_3 9	3cm^3 30
2 cm^3 75	3 cm^3 15	5 cm^3 55

L'hydrolyse acétique ramène son pouvoir rotatoire aux environs de 0°. *L'hydrolyse totale* (par HCl au 1/20, une heure à l'ébullition) *l'élève à* + 35°.

Le gynolactose ne donne lieu que très lentement à la formation d'une petite quantité d'osazone, peut-être même secondaire à l'action hydrolysante du réactif.

Nous avons caractérisé le galactose dans les produits d'hydrolyse, par l'examen microscopique de la galactose, et par la production d'acide mucique au moyen de l'oxydation nitrique. Nous n'avons pu par contre mettre en évidence le glucose. La réaction de Selivanoff s'est également montrée négative.

Le troisième glucide du lait de femme est un produit cristallisé banc, hygroscopique, très soluble dans l'alcool méthylique, de pouvoir réducteur voisin de celui du lactose donnant facilement une osazone soluble dans l'eau chaude, peu soluble à froid, d'aspect microscopique en chataignes analogue à celle du lactose. Il est aussi stable que le lactose à l'hydrolyse acétique. Par les acides forts il est hydrolysé en oses parmi lesquels nous avons caractérisé le galactose (par production d'acide mucique. La réaction de Selivanoff est négative. Rappelons que c'est là une des caractères qui différencie ce sucre des produits de transformation du lactose sous l'influence des alcalis.

Chapitre X

Technique d'isolement des glucides du lait de femme

La technique d'isolement des glucides du lait de femme, est basée sur la faible solubilité du lactose dans l'alcool méthylique, sur la solubilité plus grande des autres substances glucidiques dans ce solvant, et les détails en sont conditionnés par la nécessité d'éviter le milieu alcalin, et le souci d'altérer le moins possible les sirops par de longues évaporations à température tro pélevée.

Le lait de femme est versé dans huit à dix fois son poids d'alcool à 96^{c} et laissé en contact durant quelques heures. On filtre et le filtrat est concentré dans le vide au B. M. tiède jusqu'à ce que le liquide soit ramené à la moitié environ du volume de lait traité.

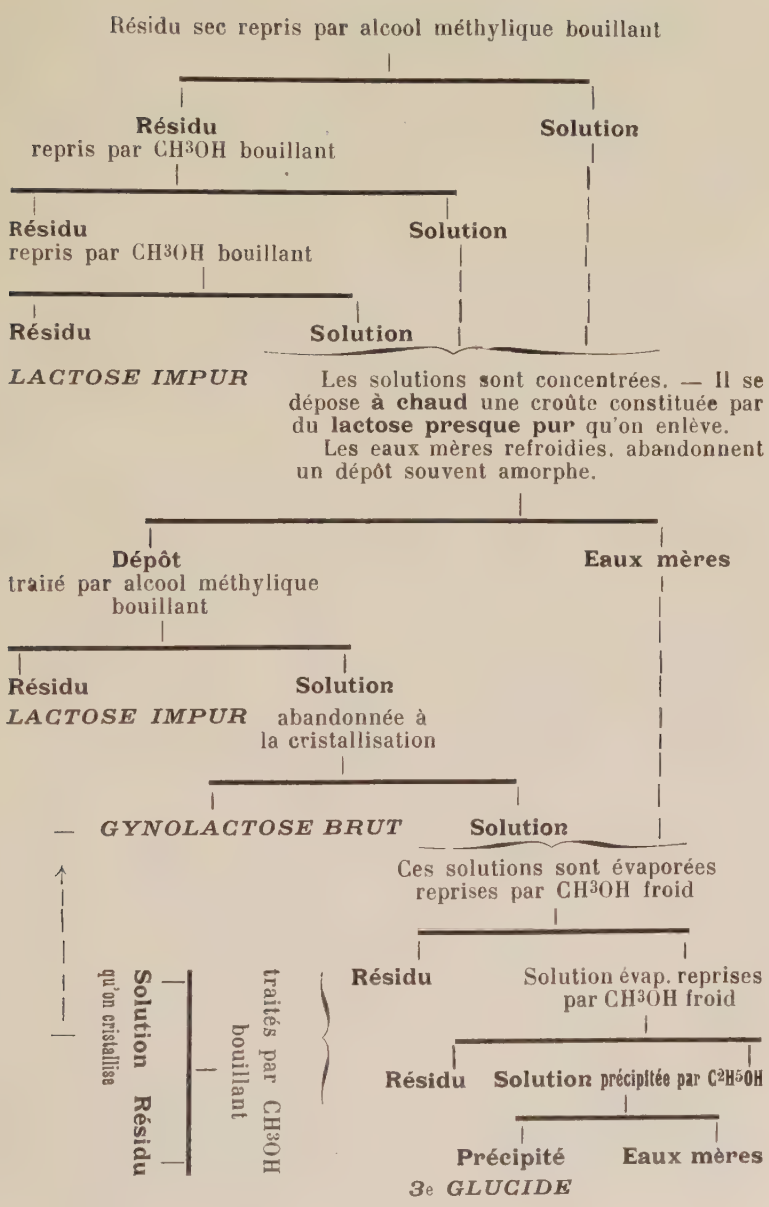
Pour éviter de trop longues évaporations, nous avons employé l'appareil suivant :

Trois ballons en verre Pyrex et d'une contenance d'environ 1 litre ½ reçoivent chacun 750 cm^3 de liquide à concentrer. Les trois récipients communiquent par l'intermédiaire de trois réfrigérants avec un même ballon relié lui-même à une trompe à vide. On peut donc faire le vide dans trois appareils d'évaporation à l'aide de la

même trompe. L'arrivée d'air est réglée par trois pinces à vis. Dès que le volume du liquide est amené dans chaque ballon à 50 cm^3 on arrête la distillation et on rassemble les résidus.

La liqueur ainsi obtenue contient une assez forte quantité de graisse. On la verse dans une ampoule à décantation et on la dégraisse d'abord à l'éther et ensuite à l'éther de pétrole. Il se forme presque toujours une émulsion mais après quelque temps de repos on peut soutirer une liqueur aqueuse que l'on filtre sur un filtre mouillé.

Cette solution aqueuse est évaporée dans le vide à siccité. On obtient ainsi un résidu que l'on traite plusieurs fois par l'alcool méthylique bouillant en suivant les opérations schématisées dans le tableau ci-après :


Résidu sec repris par alcool méthylique bouillant
Résidu
repris par CH3OH bouillant
Solution
Résidu
repris par CH3OH bouillant
Solution
Résidu
Solution
LACTOSE IMPUR
Les solutions sont concentrées. — Il se dépose à chaud une croûte constituée par du lactose presque pur qu'on enlève.
Les eaux mères refroidies, abandonnent un dépôt souvent amorphe.
Dépôt
traité par alcool méthylique bouillant
Eaux mères
Résidu
LACTOSE IMPUR
Solution
abandonnée à la cristallisation
GYNOLACTOSE BRUT
Solution
Ces solutions sont évaporées reprises par CH3OH froid
Résidu
Solution évap. reprises par CH3OH froid
Résidu
Solution précipitée par C2H5OH
Précipité
Eaux mères
3e GLUCIDE
Solution qu'on cristallise
Résidu
traités par CH3OH bouillant

Ce schéma très simplifié, ne donne que l'allure générale de l'opération. Il est évident que dans chaque expérience particulière il convient de suivre la marche de fractionnement par des déterminations judicieuses des pouvoirs rotatoires et surtout du rapport de cuivre ρ.

Chapitre XI

Dosage des glucides totaux du lait de femme par la mesure de l'indice chromique du lactosérum

La présence, dans le lait de femme, de glucides moins réducteurs que le lactose explique facilement le non dosé.

En effet, quand on exprime en lactose le pouvoir réducteur, on fait une erreur par défaut sur le poids des glucides, puisque le gynolactose est moins réducteur que le lactose. Par contre, l'estimation du lactose est de ce fait même excessive, si bien qu'en réalité le taux des substances inconnues est supérieur à la différence entre l'extrait sec et les substances dosées (1).

Pour doser les sucres du lait de femme, il serait plus correct d'exprimer en ose le pouvoir réducteur du lactosérum après hydrolyse totale. Mais il est plus simple d'appliquer au dosage des sucres la méthode d'oxydation chromique préconisée par M. Polonovski [1].

Le principe de cette méthode est le suivant : une

(1) La dénomination de « non-dosé » n'est pas rigoureuse puisque les substances réductrices qui en constituent la majeure partie sont dosées en même temps que le lactose. Il y a surtout dans le lait de femme une apparence de « non-dosé » provenant d'une interprétation incorrecte du pouvoir réducteur, d'un « mal dosé ».

substance organique est oxydée à chaud par une certaine quantité de bichromate de potassium en milieu sulfurique. L'oxydation une fois terminée on dose le bichromate restant et on en déduit la quantité de substance organique entrée en réaction.

Considérons d'abord une substance organique en solution aqueuse pure et s'oxydant complètement. Dans ce cas, la méthode serait parfaite: 1°) si l'acide chromique ne se décomposait pas légèrement sous l'effet d'une chauffe prolongée; 2°) si l'acide sulfurique et le bichromate employés, ne contenaient pas trace de matières organiques.

Pour tenir compte de ces deux sources d'erreur, il paraissait suffisant d'effectuer une opération témoin en soumettant le mélange sulfochromique à la même température pendant le même temps.

Nous avons d'abord opéré de cette façon, mais les résultats ne nous ont pas satisfait. Au lieu des 24 oxygènes nécessités par l'oxydation d'une molécule de lactose, par exemple, nous n'en trouvions souvent que 23.

Pour expliquer ce déficit, il fallait admettre que l'oxydation du lactose n'était pas complète ou que la technique de mesure de cette oxydation était défectueuse.

ETUDE DE L'OXYDATION DU LACTOSE.

Nous nous limiterons à l'étude de l'oxydation chromique du lactose effectuée à la température du B. M. bouillant par un mélange sulfochromique N/10 *dont la concentration en* SO^4H^2 *est de* 50 % *en volume.*

Cette étude pourrait paraître superflue après les tra-

vaux de Desgrez, de Simon, de Nicloux, de Boivin [1] qui ont suffisamment éclairé le processus de l'oxydation chromique. Mais ces auteurs ont surtout étudié l'oxydation chromique dans un milieu très concentré en SO^4H^2, tandis que nous opérons en présence de 50 % d'eau.

D'autre part, si l'on en excepte Simon, qui mesure l'oxydation par le volume des gaz dégagés et qui devait éviter le dégagement d'O venant de la décomposition de CrO^3, les autres expérimentateurs (Nicloux, Boivin) dosent le CO^2 formé et n'ont pas à s'inquiéter de cette décomposition. Remarquons également que ces oxydations étaient effectuées en présence d'un sel d'argent.

Cordebard [1] emploie un procédé plus voisin du nôtre, mais effectue l'oxydation par un mélange sulfochromique à 50 % *à l'ébullition*, ce qui porte la température à 140° environ.

Nous ne pouvions en raison de ces différences, appliquer à notre technique les résultats de ces auteurs.

Nous allons donc montrer que :

Le lactose en solution aqueuse à une concentration voisine de 4 0/00 *traité* 1 *heure à* 1 *h.* ½ *à la température du B. M. bouillant, est brûlé complètement suivant l'équation*

$$C^{12}H^{22}O^{11} + 24\,O = 12\,CO^2 + 11\,H^2O.$$

Nous avons employé pour le dosage du CO^2 la technique proposée par M. Polonovski et développée dans les thèses de G. Galbrun [1] et E. Bartier [1]. Le ballon d'un appareil de Desgrez recevait la solution de lactose et le mélange chromique, et était chauffé au B. M. Le CO^2 formé était absorbé par une solution de baryte et CO^3Ba filtré à l'abri de l'air, séché, calciné et pesé.

Voici d'ailleurs les détails de cette opération :

50 cm³ de mélange chromique sont introduits dans le ballon de l'appareil et chauffés pendant 1 heure ½ au B. M., tandis qu'un courant d'air purgé de CO^2 balaie l'appareil. On remplit alors d'eau de baryte le tube absorbeur et on continue le courant d'air pendant ½ heure. L'eau de baryte ne doit pas se troubler. On s'assure ainsi que les matières organiques qui souillent les réactifs ne peuvent plus donner de CO^2. On laisse alors refroidir le ballon, et on y introduit 5 cm³ de solution de lactose. Le tout est maintenu au B. M. pendant 2 heures. Au bout de ce temps, on filtre à l'aide du dispositif spécial le contenu du tube à baryte. On sèche le précipité, on calcine et on pèse.

LACTOSE HYDRATÉ A 4 gr 52 ‰	LACTOSE HYDRATÉ A 3 gr 95 ‰
Sur 5 cm³ (pipette vérifiée à 15°)	Sur 5 cm³ (pipette vérifiée à 15°)
5 gr 000	4 gr 9500
Co^3 Ba calculé 0.1487	Co^3 Ba calculé 0.1299
trouvé 0.1485	corrigé 0.1289
0.1490	trouvé 0.1265
0.1480	0.1302
	0 1292
	0.1272

Ces résultats correspondent à l'oxydation complète du lactose.

Nous nous sommes assuré que les gaz résultant de la combustion du lactose, ne contenaient pas d'oxyde de carbone. Ce gaz est en effet produit fréquemment dans l'oxydation chromique des substances organiques et Boivin a même signalé [1] que ce sont les substances de destruction sulfochromique très aisée (sucres par exemple) qui conduisent à une notable production d'oxyde de carbone.

Pour prouver l'absence d'oxyde de carbone, nous avons effectué plusieurs fois l'expérience suivante. De l'air provenant d'un gazomètre est privé du CO qu'il pourrait contenir par passage sur de l'oxyde de cuivre porté au rouge. Il passe ensuite directement dans le ballon de l'appareil de Desgrez contenant 10 cm^3 d'une solution de lactose et 100 cm^3 de mélange chromique; puis dans des flacons laveurs à NaOH, SO^4H^2, puis KOH. Les gaz ainsi traités sont enfin amenés dans un tube à anhydride iodique porté à 90° et auquel fait suite un barboteur rempli de $CHCl^3$.

L'appareil étant ainsi disposé, on chauffe le ballon au B. M. bouillant pendant 2 heures. Nous n'avons au bout de ce temps constaté aucune coloration du chloroforme.

Il est donc bien établi, tant par la mesure du CO^2 dégagé que par l'absence d'oxyde de carbone dans les produits de la combustion, que quand on traite 1 cm^3 d'une solution de lactose (de 3 à 5 0/00) par 10 cm^3 de mélange chromique N/10 (à 50% d'SO^4H^2), tout le sucre brûle à l'état de CO^2 et H^2O.

Mais pour que cette oxydation puisse être évaluée par la mesure de CrO^3 disparu, il est nécessaire que SO^4H^2 ne joue pas le rôle d'oxydant économisant ainsi une certaine quantité d'acide chromique. Si pareil fait se produisait, on devrait trouver dans les gaz dégagés de l'anhydride sulfureux. Or nous n'en avons décelé aucune trace.

On peut donc dire que dans les conditions où nous opérons, le lactose est oxydé complètement et que la combustion d'un atome de C s'accompagne de la disparition d'une quantité d'acide chromique correspondant à deux oxygènes.

ETUDE CRITIQUE DE LA MESURE DE L'OXYDATION.

Puisque l'oxydation du lactose est complète, l'erreur que nous avons primitivement constatée ne peut venir que de la décomposition spontanée de l'acide chromique ou de la présence de matières organiques dans les réactifs.

A première vue, il semblerait que l'on tienne un compte exact de ces facteurs en faisant un dosage témoin dans lequel on effectue les mêmes opérations que dans le tube à réaction à l'addition de lactose près.

On aurait ainsi dans un tube la mesure de l'oxygène consommé par

Décomposition spontanée du CrO^3 + Mat. organiques étrangères + Lactose

et dans un autre

Décomposition spontanée + Mat. org. étrangères.

La différence proviendrait de l'oxydation du lactose.

Mais puisque cette technique conduit à un chiffre de lactose trop faible, c'est que les matières organiques étrangères s'oxydent plus dans le tube témoin que dans le tube réaction et que la décomposition spontanée de l'acide chromique y est également plus importante. On en découvre facilement la raison.

On sait en effet que la vitesse d'oxydation d'une substance organique dépend étroitement de la concentration du réactif oxydant. Or quand les traces de matières organiques contenues dans les réactifs sont seules au contact du mélange chromique, leur oxydation est assez rapide. Mais quand à côté de ces souillures se trouve une certaine quantité de lactose, celui-ci accapare immédia-

tement une grosse partie de l'acide chromique et le réactif oxydant n'est plus aussi actif. Ceci fut d'ailleurs prouvé par M. Carton [1].

Pareillement, la décomposition de l'anhydride chromique n'est pas comparable dans le tube témoin et dans le tube à réaction. Dans ce dernier le lactose réduit assez rapidement une certaine quantité d'acide chromique sur laquelle la décomposition ne se fait plus sentir.

Nous croyons avoir évité ces difficultés en préparant un mélange chromique pratiquement exempt de matières organiques.

Dans un ballon de 1 litre en Pyrex, mettre 500 cm^3 d'SO^4H^2 pur et y ajouter 250 cm^3 de $Cr^2O^7K^2$, 2N/5 [$Cr^2O^7K^2$ 19,6gr. H^2O q.s.p. 1000]. Le mélange s'échauffe. On le porte sur la flamme pour maintenir durant 10 minutes sa température à 140-150°. On le laisse refroidir et on ajoute 250 cm^3 d'eau.

Le mélange ainsi préparé n'est pas rigoureusement exempt de traces de matières organiques, *mais il ne contient plus de substances capables de s'oxyder à la température du B. M.*

D'autre part, nous avons constaté que le séjour d'une heure à deux heures au B. M. ne l'altérait pas sensiblement, c'est-à-dire que la décomposition de CrO^3 y était pratiquement nulle.

TECHNIQUE DE DOSAGE DU LACTOSE PAR OXYDATION CHROMIQUE.

Dans un tube à essai on verse 1 cm^3 du liquide étudié et 10 cm^3 de mélange chromique N/10. Le liquide est agité soigneusement à l'aide d'une baguette de verre à

bout recourbé et porté 1 heure au B. M. bouillant. On laisse ensuite refroidir le tube et on verse son contenu dans environ 50 cm³ d'eau additionnée de 1 cm³ de I K au ½. On titre l'iode libéré par $S^2O^3Na^2$ N/20 en présence d'empois d'amidon, soit n cm³.

On fait deux opérations témoins: l'une à chaud, en remplaçant la solution à oxyder par un volume égal d'eau distillée, et l'autre à froid en dosant simplement la quantité d'iode libérée par 10 cm³ de $Cr^2O^7K^2$ employé. Si le mélange chromique a été bien préparé, et si l'oxydation a été suffisamment rapide, on doit dans les deux dosages témoins obtenir des résultats identiques. Soit N cm³ (si on trouve des chiffres différents pour les témoins, voir p. 92, note 2).

Sachant que 360 gr. de lactose hydraté demandent 24 oxygènes correspondant à 48 litres d'hyposulfite N, 1 cm³ de $S^2O^3Na^2$ N/20 correspond à

$$\frac{360}{48 \times 20 \times 1000} = 3 \text{ mmgr. } 75 \text{ de lactose.}$$

Si bien que la teneur en lactose 0/00 $= 3{,}75 \times (N - n)$.

$Cr^2\ O^7\ K^2$ N/10	Lactosé hyd à 4 °/₀₀	H^2O	DURÉE DE L'OXYDATION	$S^2\ O^3\ Na^2$ N 20
10 cm3	1 cm³	0	1 heure à 100°	8.3 - 8.3 - 8.4
10 cm3	0	1 cm3	—	19.1 - 19 1 - 19.2
10 cm³	0	0	non chauffé	19 1 - 19.1

Lactose hydraté 0/00 $= 3{,}75 \times 10{,}8 = 4.05$ 0/00.

DOSAGE DU LACTOSE DANS LE LAIT DE VACHE.

Avant d'appliquer à l'analyse du lait la technique que nous venons d'exposer, nous nous sommes assuré que les réactifs déféquants tels que l'acide métaphosphorique, l'acide silicotungstique, l'acide tungstique n'étaient pas oxydés par le mélange chromique. D'autre part, le chlorure de sodium à la faible concentration où il se trouve dans le lait, et dans les conditions où nous pratiquons l'oxydation, n'exerce qu'une influence minime, de l'ordre des erreurs d'expérience.

Il est cependant une autre cause d'erreur que nous ne pouvons éviter: c'est la présence dans les laits, d'acides lactique et citrique, et d'une petite quantité de composés organiques azotés que n'enlève pas la défécation, et qui s'oxydent sous l'influence du mélange chromique. Néanmoins, les dosages de lactose effectués comparativement par la méthode de Bertrand et par l'indice chromique dans le lactosérum de vache nous ont donné des résultats très voisins.

Lactose au Bertrand	Lactose dosé par l'oxydation chromique
47 gr. 50 ‰	47 gr. 40
44 gr. 20	44 gr. 40
46 gr.	46 gr. 90
41 gr.	41 gr 70

Cette concordance s'explique en dépit de ce que nous avons dit ci-dessus, par le fait que l'oxydation effectuée assez rapidement au B. M. ne brûle que fort incomplètement les matières azotées. D'autre part, les acides lac-

tique et citrique dont la concentration globale dans les laits peut être évaluée à 2 gr. n'ont pas dans l'oxydation chromique la valeur de 2 grs de lactose. Ce sont en effet des chaînes carbonées déjà plus fortement oxydées (pouvant d'ailleurs donner des produits volatils, aldéhydes, cétones, ac. acétique, qui échappent à l'action du bichromate) et dont l'oxydation exige par suite beaucoup moins d'oxygène que le lactose.

DOSAGE DES « GLUCIDES TOTAUX » DU LAIT DE FEMME.

La méthode simple et rapide que nous venons de décrire, donnant pour le dosage du lactose dans le lait de vache des résultats satisfaisants, il nous a paru licite de l'appliquer au dosage des « glucides totaux » du lait de femme. En effet, le fait que les acides lactique et citrique se trouvent dans le lait de femme et dans le lait de vache à des concentrations voisines, que l'azote restant paraît également peu important dans ces deux laits et que le prétendu indosé du lait de femme provient en réalité d'une estimation défectueuse des sucres réducteurs, rend possible la détermination par oxydation chromique des glucides du lait de femme. Nous ne pourrons évidemment pas dans ce cas comparer cette technique à une méthode consacrée par l'usage puisqu'il n'en existe aucune : mais en déterminant par la méthode de Bertrand les sucres réducteurs après hydrolyse et en les exprimant en glucose ou en galactose, nous devrons trouver un chiffre voisin de celui que fournit l'oxydation chromique. C'est ce que l'expérience vérifie fort bien.

LAITS	Sucres réducteurs après hydrolyse en grammes par litre			Glucides totaux (en hexoses) d'après l'indice chromique
	en glucose	en galactose	Moyenne	
(1)	74.48 ‰	79.08 ‰	76.78 ‰	78.2 ‰
(2)	80.76 ‰	85.60 ‰	83.18 ‰	84 ‰
(3)	73.18 ‰	77 34	75.26	75 60

Si on trouve toujours un chiffre légèrement excessif par oxydation chromique, cela tient à la présence dans les liquides de défécation d'acides lactique, citrique et des substances azotées que nous avons signalées, et aussi à la destruction par hydrolyse d'un peu de sucres réducteurs qui rend déficitaire le dosage par la méthode de Bertrand. Il faut aussi tenir compte du fait que par les méthodes de réduction après hydrolyse on ne sait en quel hexose exprimer le résultat trouvé. Peut-être peut-on encore améliorer ce procédé en variant la concentration du mélange oxydant et la température de la réaction. Mais même en son état actuel la technique que nous donnons permet de doser les glucides totaux du lait de femme avec une erreur voisine de 1 % et qui constitue un énorme progrès sur les méthodes employées jusqu'ici qui traduisaient aveuglément en lactose un « indice de réduction » et conduisaient à des erreurs par défaut pouvant largement dépasser 10 %.

DETAIL DE LA TECHNIQUE.

a) *Défécation.* — On peut employer indifféremment l'acide métaphosphorique (Lait 1 cm^3, Métaphosphate de Na à 5 % 0,3 cm^3, SO^4H^2 N/10 1 cm^3, H^2O q.s. pour 20 cm^3), ou l'acide tungstique (Lait 1 cm^3, Tungstate de soude à 10% 1 cm^3, SO^4H^2 2N/3 1cm^3, H^2O q.s.p. 20cm^3).

Pour des raisons que nous avons exprimées ailleurs, nous avons préféré l'acide silicotungstique aux concentrations suivantes: Lait 1 cm^3, Acide silicotungstique à 5 % 1 cm^3, H^2O q.s.p. 20 cm^3, filtrer.

b) *Dosage.* — 1° Tube réaction. Dans un tube à essai, 1 cm^3 du filtrat précédent et 10 cm^3 de mélange chromique N/10. Porter 1 h. 1/4 à 1 h. 1/2 au B. M. bouillant en mélangeant de temps en temps les liquides à l'aide d'un agitateur courbé qu'on laisse dans le tube. Laisser refroidir et verser ensuite *quantitativement* (en lavant plusieurs fois le tube) dans 50 cm^3 d'eau contenant 1 cm^3 de KI à 50 %. Titrer l'iode libéré par S^2O^3 Na^2 N/20, soit n cm^3.

Tube témoin. — 1 cm^3 H^2O + 10 cm^3 de mélange oxydant soumis aux mêmes opérations que le tube réaction, soit N cm^3 d'S^2O^3 Na^2 (1).

Témoin àfroid. — 10 cm^3 de mélange chromique sont versés dans l'iodure de K et l'iode libéré titré comme précédemment, soit N' cm^3.

N' doit être égal à N (2).

Glucides totaux 0/00 = 7,50 × [N - n].

(1) Si on veut augmenter la précision on peut remplacer le cm3 d'eau distillée par 1 cm3 de la solution suivante :

Acide silicotungstique à 5 %	1 cm3
NaCl à 1 0/00	1 cm3
H^2O qsp	20 cm3

(2) Si N < N c'est que le mélange chromique contient encore des matières organiques. Si on calcule la proportion de lactose d'après N on trouve un résultat trop faible, et si on prend N' on trouve un chiffre trop fort. En effet, avec le témoin à froid on ne tient aucun compte de l'altération du réactif, tandis qu'avec le témoin à chaud on en tient un compte exagéré. On peut effectuer une correction en calculant l'altération de l'excès de $Cr^2O^7K^2$ Exemple :

Témoin à froid	*Témoin à chaud*	*Réaction*	*Témoin corrigé*
19,6	19,2	15	19,5
19,6	19 2	10	19,4
19,6	19,2	5	19,3

Chapitre XII

Semi - microméthode d'analyse du lait de femme

Le dosage des « glucides totaux » tel que nous venons de l'exposer, nous a conduit à établir les bases d'une méthode complète et rationnelle d'analyse du lait de femme.

On a ces dernières années, assisté à une véritable floraison de microméthodes d'analyse biologique, mais presque toutes ont été conçues en vue de l'examen du sang, et bien peu nombreuses sont celles qui aient été appliquées à l'analyse du lait. Cependant nul n'ignore que la difficulté avec laquelle on se procure une quantité appréciable de lait de femme, rend peu pratiques les examens répétés. C'est cette lacune que nous avons tenté de combler.

Voici dans ses grandes lignes la technique que nous proposons :

Sur 1 cm^3, effectuer la défécation à l'acide silicotungstique. Sur le précipité doser les graisses et dans le filtrat les glucides totaux (cf. Chapitre précédent).

Sur 2 cm^3, déféquer par l'iodomercurate de potasse. Dans le filtrat on mesure « l'indice de réduction » vis-à-vis des liqueurs mercuriques et sur une autre portion on dose le mercure restant, ce qui permet d'en déduire la quantité de caséine.

Sur 1 cm^3, extrait sec.

A) *DOSAGE DES GRAISSES ET DES GLUCIDES TOTAUX.*

Principe. — Le lait est déféqué par l'acide silicotungstique. Le précipité de caséine et d'albumine entraîne les graisses. On filtre et sur le filtrat on dose les glucides totaux. Le coagulum est lavé à l'eau, séché et extrait à l'éther de pétrole. Le beurre est dosé ou bien par pesée après évaporation de l'éther de pétrole, ou par oxydation chromique.

Mode opératoire. — 1 cm^3 de lait est additionné de 1 cm^3 d'acide silicotungstique à 5 %. On complète à 20 cm^3 avec de l'eau distillée. La précipitation des albumines étant ainsi effectuée, il s'agit de recueillir quantitativement le précipité.

Nous avions d'abord songé à employer un procédé s'inspirant de la méthode officielle d'analyse des laits : épuiser par un mélange d'alcool et d'éther le culot de centrifugation obtenu après traitement du lait par un réactif déféquant.

Nous ne nous sommes pas arrêté à ce mode opératoire d'abord à cause du peu de cohésion du coagulum obtenu et à cause des pertes de matière grasse qu'il nous paraissait assez difficile d'éviter.

Nous avons préféré nous adresser à la filtration sur amiante, accélérée par l'action du vide. Mais en opérant ainsi, on n'obtenait qu'une filtration peu rapide due au colmatage de l'amiante, et d'autre part le coagulum resté compact était aussi mal préparé que possible à l'action dégraissante d'un solvant. Nous avons finalement adopté le mode de filtration suivant :

Nous préparons d'abord dans un petit entonnoir une

bourre d'amiante recouverte d'une couche de sable calciné qui divisera le coagulum. On jette sur ce filtre la bouillie de défécation obtenue, on filtre à la trompe et on recueille le filtrat dans un petit tube sec, disposé à l'intérieur de la fiole à essorer. Le filtrat est conservé pour le dosage des glucides totaux selon la technique développée précédemment. Le précipité est lavé à l'eau distillée froide jusqu'à ce que les eaux de lavage ne verdissent plus à chaud quelques gouttes de mélange chromique. On porte alors l'entonnoir et le filtre à l'étuve et quand la dessiccation est obtenue, on l'adapte à l'aide d'un bouchon percé d'un trou sur un ballon Pyrex taré, à long col portant une tubulure latérale reliée à une trompe. On verse alors sur le précipité de l'éther de pétrole bouillant (50 cm^3 en dix fois). Quand la filtration est terminée, on remplace l'entonnoir par un bouchon de liège, on entoure le ballon d'un B. M. et on évapore l'éther de pétrole en accélérant l'évaporation par le vide. On repèse ensuite le ballon et on a de cette façon la quantité de beurre par cm^3.

Si l'on veut doser les graisses par oxydation chromique, on effectue d'abord les mêmes opérations en prenant la précaution de graduer à 50 cm^3 le ballon dans lequel on rassemble l'éther de pétrole et quand la dissolution des graisses est terminée, on complète à 50 cm^3 avec de l'éther de pétrole.

On prélève 10 cm^3 de cette solution qu'on met dans un gros tube à essai en Pyrex et on évapore complètement le solvant d'abord au B. M. et ensuite à l'étuve. On émulsionne ensuite les graisses par addition de 1 cm^3 de lessive de soude à 1 % et séjour de quelques minutes au B. M. et on termine l'opération suivant les indications de Bang. On ajoute au liquide émulsionné 10 cm^3 de mélange chromique N/10 et 20 cm^3 d'SO^4H^2 concentré. On

laisse un quart d'heure en contact et on titre le bichromate en excès comme il a été dit à propos du dosage des glucides totaux (1).

On calcule la proportion de graisse sachant que 1 mmgr. détruit 2 cm^3 45 de $Cr^2O^7K^2$ N/10.

B) *DOSAGE DE LA CASEINE ET DETERMINATION DE « L'INDICE DE REDUCTION » MERCURIQUE.*

Le procédé que nous préconisons permet de faire ces deux déterminations sur la même prise d'essai.

1° *Caséine.* — Le principe du dosage de la caséine s'inspire du procédé volumétrique de Denigès. Le lait est mis au contact d'une quantité exactement titrée d'un sel de mercure. La caséine précipitée entraîne une certaine quantité de mercure. Il suffit de doser le Hg resté en solution et de se reporter à des tables dressées d'avance pour trouver la correspondance entre le métal fixé et la caséine.

Denigès [3] emploie dans ce dosage la cyano-argentimétrie, mais pour les quantités minimes de métal que nous devions évaluer, cette méthode nous a paru difficilement applicable et nous avons eu recours à la réduction du mercure à l'état métallique et à son dosage par la méthode de Baudouin [1]. Ce procédé consiste à traiter le mercure précipité par un excès d'iode (obtenu par réaction d'une solution acide d'IO^3K sur de l'iodure de K). Le métal passe à l'état d'iodure mercurique et on dose l'iode en excès par S^2O^3 Na^2.

(1) Comme $SO4H2$ employé contient des traces de matières organiques, il convient d'effectuer une opération témoin.

Nous avions d'abord pensé employer comme réducteur le formol ou l'hypophosphite de soude, mais nous nous sommes finalement arrêté à une technique utilisant comme agent de réduction le lactose du lait lui-même. Il ne paraissait pas à première vue que ce choix fut judicieux, car le lactose fixe l'iode et ceci apparaissait comme devant gêner le dosage du Hg par l'iode disparu. Mais le lactose se trouvant dans le lait gênerait le dosage quel que soit le réducteur employé et la seule solution qui nous apparut fut de réduire le sel mercurique par le sucre du lait et d'éliminer en second lieu l'excès de ce dernier, la réduction une fois terminée.

Le moyen le plus commode était évidemment la séparation du Hg précipité au moyen de la centrifugation. Mais le dépôt métallique ainsi produit ne se dissout dans l'iode qu'avec une extrême lenteur.

C'est alors que nous avons songé à employer un artifice (utilisé dans le dosage du sucre par la méthode de Fontès et Thivolle [1]) qui consiste à englober le précipité de Hg dans du carbonate de magnésie produit au sein de la liqueur elle-même par addition de solutions de CO^3Na^2 et de SO^4Mg.

Voici donc le mode opératoire auquel nous nous sommes arrêté :

Liqueurs nécessaires I) HgI^2, 22 gr. 72.
KI, 50 gr.
H^2O qsp, 1000 cm^3
II) IO^3K, 1 gr. 783.
SO^4H^2, 50 gr.
H^2O qsp, 1000 cm^3

a) *Défécation.* — On mesure dans un ballon jaugé de 10 cm^3, 2 cm^3 de lait, 2 cm^3 d'iodomercurate de K n/20 et 1/10 de cm^3 d'acide acétique crist. On complète à

10 cm^3 avec de l'eau et on filtre. On mesure 5 cm^3 de filtrat dans un tube en Pyrex de 20 cm. × 2 cm.; on y ajoute 2cm^3 de NaOH norm. et 10cm^3 d'eau, et on porte le tube au B. M. durant 3 minutes. La totalité du mercure est réduite par le lactose qui, dans les conditions où nous nous plaçons, se trouve toujours en très gros excès.

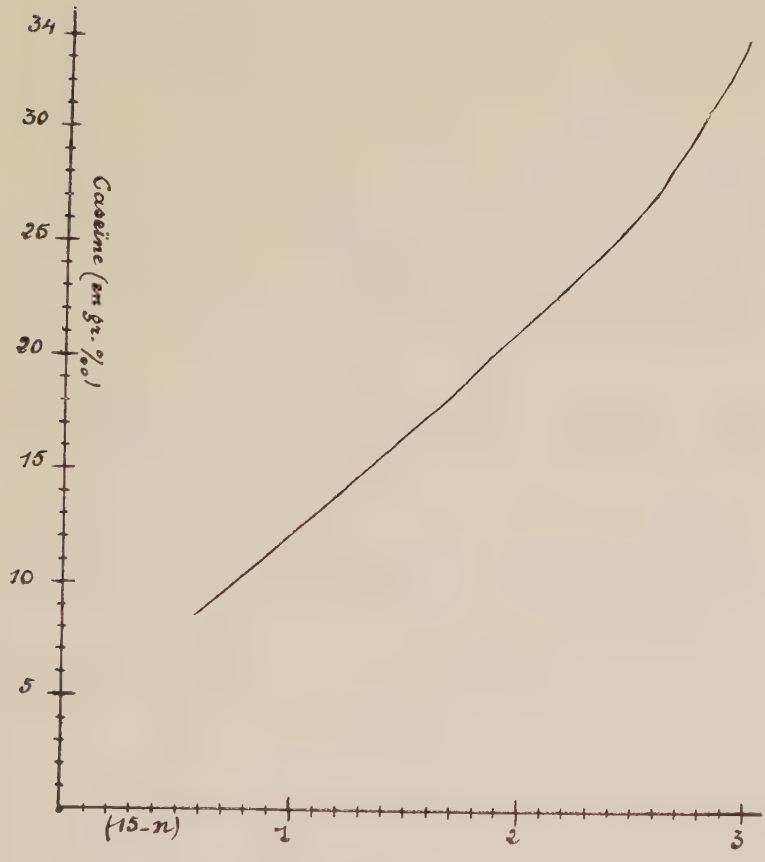
Quand la réduction est terminée, on ajoute au liquide encore chaud 1/2 cm^3 de CO^3Na^2 à 10 % et 1/2 cm^3 de SO^4Mg saturé. Le CO^3Mg précipité englobant le mercure. On remplit alors les tubes avec de l'eau, pour diminuer la concentration du lactose restant et on centrifuge. On jette les liqueurs surnageantes, on dilue le culot dans un peu d'eau en agitant le tube par secousses latérales, on remplit les tubes avec de l'eau et on centrifuge. Deux lavages ainsi soigneusement pratiqués enlèvent la totalité du lactose. On ajoute alors au culot de centrifugation 1 cm^3 d'IK à 25 % et 5 cm^3 d'iodate de K N/20. On laisse s'effectuer la dissolution du mercure et on titre l'excès d'iode par $S^2O^3Na^2$ N/100. Soit *n* cm^3.

Le chiffre n - 15 permet de se reporter à la courbe que nous avons construite et qui donne directement le poids de caséine par litre de lait.

Explication de la constante 15. — Supposons que l'on n'ajoute pas de lait à l'iodomercurate. Les 5 cm^3 du filtrat sont exactement centinormaux en Hg. Quand après réduction, on ajoute 5 cm^3 d'IO^3K [N/20 en iode], c'est-à-dire 25 cm^3 d'iode N/100, 10 cm^3 de cette liqueur disparaissent par action des 5 cm^3 de Hg N/100 ($Hg + I^2 = Hg\ I^2$) et il reste 15 cm^3 d'iode N/100.

Il est rare que l'on trouve exactement 15 cm^3; aussi est-il nécessaire de faire une opération témoin en soumettant simplement la solution d'iodomercurate aux dilutions et aux réductions indiquées. On remplace alors

dans le calcul le chiffre 15 par le nombre de cm^3 ainsi trouvé.



2° *Mesure de l'indice de réduction mercurique.* — Nous avons indiqué plus haut les raisons pour lesquelles les

méthodes de réduction cuprique et mercurique ne pouvaient être appliquées au dosage des sucres du lait de femme. Toutefois, comme il peut être utile, pour évaluer les proportions respectives des trois sucres, de déterminer le pouvoir réducteur du lactosérum de femme et que d'autre part la méthode que nous allons décrire s'applique (en toute rigueur cette fois) au dosage du lactose dans le lait de vache, il ne nous a pas paru déplacé de la donner ici.

Cette méthode n'est d'ailleurs que l'application au lactose de la méthode employée par Baudouin et Lewin [1] pour le dosage du sucre sanguin et qui consiste à chauffer en milieu légèrement alcalin la solution sucrée au contact d'un excès d'iodomercurate de K ou de Na. Le sel mercurique est réduit et le mercure précipite en quantité proportionnelle au sucre entrant en réaction. Pour doser le Hg précipité, on le dissout dans une quantité titrée d'iode, et on dose par l'hyposulfite l'iode resté libre.

Ce procédé peut être appliqué dans des limites d'alcalinité assez larges, mais il est bon d'opérer sur des solutions voisines de la neutralité.

Technique du dosage. — Le dosage s'effectue sur 1 cm³ du filtrat obtenu précédemment pour le dosage de la caséine. Ce liquide est acide et son acidité est toujours voisine de 1 cm³75 de NaOH N/10 pour 1 cm³. Dans un tube Pyrex, on mesure donc 1 cm³ du filtrat, 1 cm³ 75 de NaOH N/10, 5 cm³ du réactif iodomercurique alcalin de Baudouin (1) et 10 cm³ d'eau. On porte trois minutes au B. M. bouillant. Le mercure réduit précipite. On re-

(1) I_2 Hg 3 gr 60
NaI désséché — 12 gr
NaOH n. 100 cm³
H_2O q s p. 200 cm³

froidit le tube sous un courant d'eau, on ajoute 10 cm^3 de la solution sulfurique d'iodate de potasse N/20 et on bouche le tube. L'iodate réagissant sur l'iodure en milieu acide dégage de l'iode en quantité connue. Cet iode, à l'état naissant, dissout facilement le mercure. Néanmoins cette solution n'est pas instantanée et elle peut même devenir assez lente si on a laissé s'effectuer pendant un temps trop long la sédimentation du mercure.

Dès que tout le dépôt de Hg aura disparu, et que la liqueur sera absolument limpide, on titrera l'excès d'iode par $S^2O^3Na^2$ N/40. Soient n cm^3.

La différence (20 - n) permettra de calculer la quantité de lactose sachant que 1 mmgr. 428 de lactose hydraté correspond à 1 cm^3 d'$S^2O^3Na^2$ N/40.

Remarquons que le dosage ainsi pratiqué n'est pas applicable aux laits fermentés. Dans ce cas, en effet, il existe une grosse quantité d'acide lactique et de peptones qui fixent de l'iode. Pour doser les sucres dans un lait fermenté, il faut après réduction centrifuger le mercure englobé dans CO^3Mg et terminer le dosage comme il a été indiqué à propos de la caséine, en utilisant évidemment les mêmes liqueurs que dans le dosage du lactose non modifié.

Ce travail a-t-il éclairci parfaitement toutes les anomalies constatées dans le lait de femme ? Nous ne le pensons pas.

De même que les déterminations effectuées sur certaines fractions obtenues au cours des cristallisations ne s'expliquaient pas entièrement par la présence de gynolactose et nous ont conduit à isoler un troisième glucide, de même certaines divergences dans les analyses de produits solubles dans l'alcool méthylique nous ont parfois fait penser qu'une donnée du problème nous échappait encore. Peut-être faut-il en chercher la cause dans l'hydrolyse facile du gynolactose. Il est probable en effet que sous l'influence des concentrations multiples, ce sucre libère un nouveau glucide qui vient augmenter la difficulté des purifications. Nous avions d'abord pensé que le gynolactose sous l'influence d'une hydrolyse légère se transformait en notre troisième sucre, mais certains essais ont rendu cette hypothèse peu probable, le pouvoir réducteur du gynolactose restant après l'action de l'acide acétique inférieur à celui du troisième glucide. Enfin, il est hors de doute que certaines peptones non précipitées par les réactifs habituels de défécation influent également sur le pouvoir rotatoire du lactosérum.

On voit que notre thèse, loin de clore un chapitre de la chimie du lait de femme, ouvre au contraire le champ à de nombreux travaux. L'étude de la constitution des nouveaux glucides exigera probablement de longues recherches. Peut-être même d'autres sucres viendront-ils s'ajouter à ceux que nous avons déjà découverts !

Nous nous proposons aussi d'étudier les autres laits (lait d'anesse par exemple) qui présentent une anomalie optique.

Au point de vue biologique, le problème ne s'annonce pas moins vaste. Nous avons déjà laissé entrevoir qu'il existait suivant l'âge du lait des variations dans les concentrations respectives des différents glucides. Nous en continuerons l'étude. De nombreuses expériences seraient également à vérifier au sujet de l'action synthétisante de la glande mammaire.

Ainsi, ce mémoire qui nous a demandé plusieurs années d'un travail continu (Polonovski et Lespagnol [2] à [12], n'est-il que l'ébauche et l'annonce de travaux à venir que nous nous proposons de poursuivre.

On avait depuis longtemps constaté que les laits des mammifères différaient par la nature de certains composants peptidiques ou lipidiques, mais on croyait pouvoir faire une exception pour les glucides et admettre avec Denigès que le lactose était l'unique sucre des sécrétions mammaires. Cette exception doit disparaître également. Dans le lait de femme se trouvent au moins deux glucides différents du lactose et il est, croyons-nous, permis de supposer que les anomalies constatées dans d'autres laits seront expliquées également par la présence de nouveaux sucres particuliers.

Trouverons-nous une explication biologique de tous ces faits, et existe-t-il une corrélation entre les structures de ces glucides et certaines diastases adaptées à leur dégradation et propres à chaque espèce ?

Ce sont là des questions qui cotoient les caractéristiques chimiques des espèces et dont la résolution, qu'on ne peut entrevoir que fort lointaine, livrerait une parcelle du secret et du mystère de la vie.

CONCLUSIONS

Quand nous avons entrepris l'étude du lait de femme, l'existence dans ce lait d'un non dosé et la discordance entre les quantités de lactose calculées d'après les pouvoirs réducteurs et rotatoire, n'avaient encore reçu aucune explication satisfaisante.

1°) Nous apportons la preuve de la nature glucidique de ce non dosé et nous montrons qu'il se complique d'un « mal dosé », l'indice de réduction que l'on traduisait jusqu'ici uniquement en lactose se répartissant en fait entre cet oside et les autres composés glucidiques.

2°) Après avoir prouvé que tous les sucres du lait de femme étaient réducteurs, nous en avons isolé un glucide légèrement lévogyre, beaucoup moins réducteur que le lactose et que nous avons appelé « gynolactose ». Nous en avons décrit quelques propriétés.

3°) Les caractères du gynolactose n'expliquant pas encore entièrement les constantes initiales des lactosérums étudiés, nous avons continué nos essais de fractionnement et nous avons abouti à la découverte d'un troisième sucre un peu moins réducteur que le lactose et de faible pouvoir rotatoire.

4°) Nous avons décrit une technique d'isolement de ces différents glucides, et nous en avons donné un pro-

cédé de dosage basé sur la détermination de « l'indice chromique ».

5°) Pour distinguer les sucres isolés des produits de l'altération du lactose sous l'influence des milieux alcalins, nous avons étudié les composés obtenus par action des alcalis sur le lactose.

6°) Pour permettre les examens de lait sur quelques centimètres cubes, nous avons mis au point une microméthode d'analyse. Nous avons ainsi été conduit à étudier la réduction des sels mercuriques par le lactose, à préciser une technique de dosage de la caséine, à appliquer des méthodes basées sur l'oxydation chromique, au dosage des glucides totaux et des graisses.

——«»——

Vu : Bon à imprimer :
Le Président de la thèse,
M. POLONOVSKI

Vu :
Le Doyen,
Ch. DUBOIS

Vu et permis d'imprimer,
Le Recteur de l'Académie,
CHATELET

BIBLIOGRAPHIE

—o—

OUVRAGES CONSULTÉS

ABDERHALDEN. — *Biochemisches Haudlexikon.* J. Springer, Edit, Berlin.

CRAMER. — *Les sucres et leurs dérivés.* Encycl. scient. Doin, Edit., Paris.

DENIGÈS. — *Précis de Chimie Analytique.* Maloine, Edit., Paris.

MOREL. — *Précis de Technique Chimique.* Doin, Edit., Paris.

OPPENHEIMER. — *Haudbuch der Biochemie.* G. Fischer, Edit., Jena.

VILLIERS, COLM, FAYOLLE. — *Traité d'Analyse des matières alimentaires.* Doin, Edit., Paris.

BARTIER E. [1]. — *Sur une technique nouvelle de dosage du Carbone organique.* Thèse Pharmacie, Lille, 1924.

BAUDOIN et LEWIN [1]. — *Une nouvelle méthode de dosage de petites quantités de sucre.* Bull. Soc. Chim. Biol., T. 9, 1927, p. 480.

BOIVIN [1]. — *Le microdosage du Carbone par oxydation chromique.* Conférence à la Société de Ch. biol ; Bull. Soc. Ch. biol., T. XI, N° 10, Décembre 1929.

BRACHIN [1]. — *Recherches sur la lactase.* Thèse Pharmacie, Paris, 1904.

CARTON M. [1]. — *Recherches sur l'oxydation chromique des alcools.* Thèse Pharmacie, Lille 1924.

CORDECHARD [1]. — *Vérification de la pureté des composés organiques complètement oxydés par le mélange chromique.* Thèse Pharmacie, Nancy, 1922.

CRAMER [1]. — *Les sucres et leurs dérivés.* Encycl. Scient., Doin, Edit., p. 93.

DENIGÈS [1]. — *Contribution à l'étude des lactoses.* Thèse Pharmacopat supérieur. Paris, 1892.

DENIGÈS et BONNANS [2]. — *Pouvoir rotatoire et pouvoir réducteur de la lactose.* Journ. de Ph. et Ch. 5, p. 363, 1888.

DENIGÈS [3]. — *Dosage de l'ensemble des albuminoïdes du lait.* Précis de Chimie Analytique, p. 958.

DUBRUNFAUT [1]. — *Note sur le sucre de lait.* Comp. rend. Acad. Sciences, T. 42, p. 228, 1856.

ESBACH [1]. — *Sur la lactose et l'unification des lactoses.* Journ. de Ph. et Ch., p. 533, 1888.

FISCHER et MEYER [1]. — *Oxydation des Milchzuckers.* Berichte. chem. Ges., T. 22, p. 361, 1889.

FISCHER [2]. — *Uber die Verbindungen des Phenylhydrazins mit dem Zuckerarten.* Berichte. chem. Ges., T. 21, p. 2631, 1888.

FONTÈS et THIVOLLE [1]. — *Méthode de microdosage manganimétrique du Glucose.* Bull. Soc. Ch. biol., T. 3, p. 226, 1921.

GALBRUN (Geneviève) [1]. — *Dosage du Carbone par voie humide.* Thèse Pharmacie, Lille, 1924.

GUIART et GRIMBERT [1]. — *Précis de Diagnostic.* Lamarre, Edit., Paris.

GUIRAUD [1]. — *Le lait de femme à l'état physiologique.* Thèse Médecine, Bordeaux, 1897.

HAWORTH et PEAT [1]. — *A revision of the structural Formula of Glucose.* Journ. of the Ch. Soc. of London, 1926, p. 89.

HAWORTH et LEICHT [2]. — *The constitution of the Disaccharides.* Journ. of the Ch. Soc. of London, 113, 1928, p. 188.

HAWORTH, WALTER NORMANN und Ch. W. LONG [3]. — *The constitution of the Disaccharides - Lactose.* Berichte ub. die ges. Physiol., T. 41, p. 457, 1927.

HESSE [1]. — *Uber die Bildung des Milchzuckers in der Milchdrüse.* Bioch. Zeitschrift, T. 138, p. 441, 1923.

HEWITT et PRYDE [1]. — Bioch. Journ., T. 14, p. 395, 1920.

HIRST [1]. — *The structure of the normal Monosaccharide.* Journ. of the Ch. Soc. London, 1926, p. 350.

HILDT [1]. — *Sur le dosage des sucres par inversion.* Annales de Ch. analyt. et de Ch. appl., T. 2, p. 105, 1920.

LEVENE [1]. — *Lactone formation of lactobionic acids and its bearing on the structure of lactose.* Ber. ub. die ges. Phys., T. 40, p. 628, 1927.

LOBRY DE BRUYN [1]. — *Action des alcalis dilués sur les hydrates de Carbone.* Recueil des Trav. chim. des Pays-Bas : T. 14, 1895, p. 156 et p. 203 ; T. 15, 1896, p. 92 ; T. 16, 1897, p. 262 et 274 ; T. 18, 1899, p. 147.

Lündsgaard et Holböll [1]. — *Glucose instable du Sang.* Journal of biological chemistry, T. 62, 1924, p. 453; T. 65, 1925, p. 305, 328, 343.

Meillère [1]. — *Détermination du résidu sec du lait.* Journ. Ph. et Ch., 1915, p. 167.

Morel [1]. — *Précis de Technique chimique,* p. 388. Doin, Edit.

Pichon-Vendueil [1]. — *Sur les amino-acides du lait.* Journ. Sciences Pharm., T. XXVIII, 1921, p. 361.

Pictet (A.) [1]. — *Synthèse du Lactose.* Ber. ub. die ges. Physiol., T. 40, 1927, p. 22.

Pictet (A.) et Vogel [2]. — *Synthèse du Lactose.* Comp. rend. Ac. Sciences, T. 185, n° 5, 1927, p. 332.

Porcher [1]. — *Calcul de la proportion de lactose dédoublée dans une solution de ce sucre soumise à l'action de la lactase.* Bull. Soc. chimique, T. 33, 1905, p. 1283.

Polonovski (Michel) [1]. — *Microdosage des substances réductrices. Indice de bichromate.* C. R. Soc. Biologie, LXXXVI, 1922, p. 853.

Polonovski (Michel) et A. Lespagnol [2]. — *Microdosage du lactose dans le lait.* Bull. Soc. Ch. biol., T. 9, p. 1110, 1927.

Id. [3]. — *Sur la nature glucidique de la substance lévogyre du lait de femme.* C. R. Soc. biol., T. CI, p. 61, 1929.

Id. [4]. — *Sur l'hydrolyse du glucide lévogyre du lait de femme.* C. R. Soc. biol., T. CI, p. 64, 1929.

Id. [5]. — *Sur la substance lévogyre du lait de femme.* C. R. Soc. biol., T. CII, p. 789, 1929.

Id. [6]. — *Technique de concentration du lactosérum de femme en substance lévogyre glucidique.* C. R. Soc. biol., T. CII, p. 792, 1929.

Id. [7]. — *Le glucide lévogyre du lait de femme est réducteur.* C. R. Soc. biol., T. CII, p. 793, 1929.

Id. [8]. — *Un nouveau constituant glucidique du lait de femme : le Gynolactose.* C. R. Soc. biol., T. CIII, juin 1930, p. 553.

Id. [9]. — *Sur la présence de plusieurs glucides dans le lait de femme.* C. R. Soc. biol., T. CIII, juin 1930, p. 555.

Id. [10]. — *Technique d'isolement des glucides du lait de femme.* C. R. Soc. biol., T. CIII, juin 1930, p. 557.

Id. [11]. — *Sur une erreur systématique dans le dosage du lactose dans le lait de femme : Indosé réel du lactosérum.* C. R. Soc. biol., T. CIV, juillet 1930.

Id. [12]. — *Sur une semi-microméthode d'analyse rapide et complète du lait.* Bull. Soc. Ch. biol., T XI, p. 800, 1929.

Reinbrecht [1]. — *Uber Lactose und Maltose Carbonsaüse.* Lieb. Ann. der Ch., T. 272, p. 197, 1892.

Richaud et Coirre [1]. — *Indications fournies par le polarimètre dans le métabolisme des sucres de l'organisme.* Bull. Soc. Ch. biol., T. 5, p. 890, 1923.

Rüff et Ollendorf [1]. — *Abbau von d. Galactose und von Milchzucker.* Ber. d. deut. chem. Ges., T. 33, 1900, p. 1798.

Schmöger et Erdmann [1]. — Ber. d. deut. ch. Ges., T. 13, p. 2180, 1880.

Schmöger [2]. — Ibid., T. 13, p. 1915, 1880.

Schoorl [1]. — *Uréides des sucres.* Recueil des Tr. chim. des Pays-Bas, T. 22, p. 31, 1903.

Sichuro-Miura [1]. — *Dosage du Lactose.* Le Lait, 1921, p. 517.

Tanret (Ch.) [1]. — *Sur les modircations moléculaires et la multirotation des sucres.* Bull. Soc. Ch., T. 15, p.352, 1896.

Tollens [1]. — Ber. d. deut. ch. Ges., T. 16, p. 921, 1883.

Van Leent [1]. — Thèse de la Faculté de Bâle, 1894.

Yvon et Michel [1]. — *Analyse des Urines*, p. 423, Doin, Edit., 1920.

—o—

TABLE DES MATIÈRES

PAGES

Introduction 9

Chapitre I. — *Propriétés du lactose* 13

A) Formule du lactose 13

B) Pouvoir rotatoire du lactose 17

C) Hydrolyse du lactose 18

D) Transformations du lactose sous l'influence des alcalis. 21

Chapitre II. — *La double énigme du lait de femme*. . . . 29

A) Détermination de l'indosé du lait de femme. . 30

1° Détermination du résidu sec 30

2° Dosage des matières grasses 33

3° Dosage de la caséine 33

4° Dosage du lactose 34

5° Dosage des cendres. 35

B) L'anomalie optique du lait de femme 36

Chapitre III. — *Considérations sur la nature de l'indosé du lait de femme*. 41

Chapitre IV. — *Le lactosérum de femme*. 45

A) Pouvoirs rotatoire et réducteur. 45

B) Action des différents acides sur le lactosérum de femme. 46

I. Action des acides forts 46

II. Action de l'acide acétique 48

III. Action de l'acide benzène sulfonique. 49

Chapitre V. — *Essais d'isolement de la substance lévogyre du lait de femme* 51

Chapitre VI. — *Les glucides du lait de femme sont réducteurs.* 57

Chapitre VII.— *Un nouveau glucide du lait de femme: le Gynolactose.* 61

Chapitre VIII. — *Le lactose et le gynolactose ne sont pas les seuls glucides du lait de femme* 69

Chapitre IX. — *Quelques propriétés des nouveaux glucides du lait de femme* 75

Chapitre X. — *Technique d'isolement des glucides du lait de femme* 77

Chapitre XI. — *Dosage des glucides totaux du lait de femme par la mesure de l'indice chromique du lactosérum.* 81

1° Etude de l'oxydation du lactose 82

2° Etude critique de la mesure de l'oxydation.... 86

3° Technique 87

4° Dosage du lactose dans le lait de vache..... 89

5° Dosage des «glucides totaux» du lait de femme. 90

6° Technique.. 91

Chapitre XII. — *Semi microméthode d'analyse du lait de femme.* 93

A) Dosage des graisses et des glucides totaux.... 94

B) Dosage de la caséine et détermination de l'indice de réduction mercurique. 96

Conclusions. 105

Bibliographie 107